

# Citotoksično djelovanje odabranih biljaka iz porodice kupusnjača na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom

---

**Vukančić, Kristina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:731780>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-29**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET  
I  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Kristina Vukančić**

**Citotoksično djelovanje odabranih biljaka iz porodice kupusnjača na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom**

**Diplomski rad**

**Akadska godina 2017. /2018.**

**Mentor: Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, rujan, 2018. godine**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

## DIPLOMSKI RAD

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet**  
**Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA**  
**Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno polje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Medicinska kemija i biokemija  
**Tema rada** je prihvaćena na 53. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić  
**Pomoć pri izradi:** izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić,

**Citotoksično djelovanje odabranih biljaka iz porodice kupusnjača na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom**  
Kristina Vukančić, broj indeksa 81

### Sažetak:

Cilj istraživanja je bio ispitati citotoksični učinak određenih biljaka iz porodice kupusnjača na dvije stanične linije humanih karcinoma: T24 i TCCSUP. Korišteni su ekstrakti iz *Allium neapolitanum* Cirillo, ekstrakti iz *Bunias erucago* L. te hidrodestilat i mikrovalni ekstrakt iz *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. Stanice karcinoma mokraćnog mjehura tretirane su ekstraktima različitih dijelova biljaka u koncentraciji od 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72h korištenjem MTT metode. Omjer apsorbancije stanica tretiranih vodenim otopinama ekstrakata te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih ekstrakata. Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju T24 ostvario je hidrodestilat iz *Diplotaxis tenuifolia* pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije. Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju TCCSUP, također je pokazao hidrodestilat iz *Diplotaxis tenuifolia* je pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije. Djelovanje ekstrakata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica. Citotoksični učinak odabranih biljaka iz porodice kupusnjača je potvrđen, a idući korak je potvrđivanje tih učinaka u *in vivo* istraživanju na modelima karcinoma mokraćnog mjehura kod životinja.

Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2016-06-1316.

**Ključne riječi:** biljke, karcinom, citotoksičnost, MTT metoda

**Rad sadrži:** 66 stranica, 27 slika, 6 tablica, 26 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Prof.dr.sc. Maja Valić, predsjednik
2. Doc.dr.sc. Ivana Mudnić, član
3. Izv.prof.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

**Datum obrane:** 26. rujna 2018.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine**

**Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia**

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Medical Chemistry and Biochemistry  
**Thesis subject:** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 53 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology and Faculty Council of School of Medicine  
**Mentor:** Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD  
**Technical assistance:** Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD

**The cytotoxic effect of the plants from the *Brassicaceae* family on various cell lines of human cancers measured by the MTT assay**

Kristina Vukančić, index number 81

### Summary:

The main goal of this research is to examine the cytotoxic effects of the plants from the *Brassicaceae* on cell lines of human bladder carcinomas: T24 and TCC-SUP. There were used the extracts from *Allium neapolitanum* Cirillo, *Bunias eucago* L. and hydrodistillate and microvawe extract from *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. Bladder carcinoma cells were treated with extracts from different parts of plants at a concentration of 1, 5, 10, 50 and 100 µg/mL. Cytotoxicity had been determined after 4, 24, 48 and 72 h by using the MTT method. The ratio between the absorbance of the cells treated with aqueous solutions of the extracts and the absorbance of those which were not, is the index of cytotoxic activity of the extracts. The best cytotoxic effect on T24 cell line had hydrodistillate from *Diplotaxis tenuifolia* at a concentration of 100 µg/mL after 72 h of incubation. The best cytotoxic effect on TCC-SUP cell line had also hydrodistillate from *Diplotaxis tenuifolia* at a concentration of 100 µg/mL after 72 h of incubation. The activity of extracts is not always proportional to concentration and time of incubation, and in some cases cells may recover. The cytotoxic effect of these *Brassicaceae* plants was confirmed, and the next step regards the validation of these effects could be *in vivo* testing by using animal bladder carcinoma model.

This research has been fully supported by the Croatian Science Foundation under the project (HRZZ-IP-06-2016-1316 "Plants as a source of bioactive sulphur compounds and their ability to hyperaccumulate metals").

**Keywords:** plants, cancer, cytotoxicity, MTT assay

**Thesis contains:** 66 pages, 27 figures, 6 tables, 26 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Maja Valić, PhD, full prof., chair person
2. Ivana Mudnić, PhD, assist. prof., member
3. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, assoc. prof., member - supervisor

**Defence date:** September 26<sup>th</sup> 2018

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici na uloženom trudu i vremenu, te na prijateljskom pristupu, strpljenju i pomoći prilikom pisanja ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se i svojoj obitelji na bezuvjetnoj potpori tijekom cijelog studija, te prijateljima i kolegama na podršci i motivaciji. AMDG*

# SADRŽAJ

|       |                                                       |    |
|-------|-------------------------------------------------------|----|
| 1.    | UVOD .....                                            | 1  |
| 1.1   | KARCINOM .....                                        | 2  |
| 1.1.1 | Onkogeni i tumor supresorski geni .....               | 2  |
| 1.2   | KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA .....                      | 3  |
| 1.2.1 | Epidemiologija i etiologija .....                     | 3  |
| 1.2.2 | Patohistologija .....                                 | 4  |
| 1.2.3 | Klinička slika .....                                  | 4  |
| 1.2.4 | Dijagnostika .....                                    | 5  |
| 1.2.5 | Klasifikacija tumora .....                            | 6  |
| 1.2.6 | Liječenje .....                                       | 9  |
| 1.3   | KUPUSNJAČE .....                                      | 10 |
| 1.3.1 | <i>Allium neapolitanum</i> Cirillo .....              | 11 |
| 1.3.2 | <i>Bunias erucago</i> L. ....                         | 13 |
| 1.3.3 | <i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.) DC .....            | 14 |
| 2.    | CILJ ISTRAŽIVANJA .....                               | 16 |
| 3.    | MATERIJALI I METODE .....                             | 18 |
| 3.1   | STANIČNE LINIJE .....                                 | 19 |
| 3.2   | BILJNI MATERIJALI .....                               | 21 |
| 3.2.1 | <i>Allium neapolitanum</i> Cirillo .....              | 21 |
| 3.2.2 | <i>Bunias erucago</i> L. ....                         | 22 |
| 3.2.3 | <i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.) DC .....            | 23 |
| 3.3   | POSTUPAK .....                                        | 24 |
| 3.4   | TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI .....                    | 25 |
| 4.    | REZULTATI .....                                       | 26 |
| 4.1.  | KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA- STANIČNA LINIJA T24 ..... | 27 |
| 4.1.1 | <i>Allium neapolitanum</i> cvijet .....               | 27 |

|       |                                                           |    |
|-------|-----------------------------------------------------------|----|
| 4.1.2 | <i>Allium neapolitanum</i> stabljika + list.....          | 28 |
| 4.1.3 | <i>Bunias erucago</i> cvijet.....                         | 29 |
| 4.1.4 | <i>Bunias erucago</i> korijen .....                       | 30 |
| 4.1.5 | <i>Diplotaxis tenuifolia</i> hidrodestilat.....           | 31 |
| 4.1.6 | <i>Diplotaxis tenuifolia</i> mikrovalni ekstrakt.....     | 32 |
| 4.2   | KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA – STANIČNA LINIJA TCCSUP ..... | 33 |
| 4.2.1 | <i>Allium neapolitanum</i> cvijet .....                   | 33 |
| 4.2.2 | <i>Allium neapolitanum</i> stabljika + list.....          | 34 |
| 4.2.3 | <i>Bunias erucago</i> cvijet.....                         | 35 |
| 4.2.4 | <i>Bunias erucago</i> korijen .....                       | 36 |
| 4.2.5 | <i>Diplotaxis tenuifolia</i> hidrodestilat.....           | 37 |
| 4.2.6 | <i>Diplotaxis tenuifolia</i> mikrovalni ekstrakt.....     | 38 |
| 5.    | RASPRAVA.....                                             | 39 |
| 6.    | ZAKLJUČAK .....                                           | 47 |
| 7.    | LITERATURA.....                                           | 49 |
| 8.    | SAŽETAK.....                                              | 53 |
| 9.    | SUMMARY .....                                             | 55 |
| 10.   | ŽIVOTOPIS .....                                           | 57 |

## **1. UVOD**

## 1.1 KARCINOM

Karcinom je genska bolest koja nastaje kao posljedica niza stupnjevutih promjena u genima potrebnim za normalnu diobu, rast, diferencijaciju i smrt stanice, koje u konačnici rezultiraju nekontroliranom proliferacijom stanica te zloćudnom preobrazbom. Ono što zajednički nazivamo karcinomom zapravo je skup različitih bolesti koje se razlikuju prema svojoj etiologiji, biologiji i kliničkoj slici te, posljedično i po načinu liječenja. Svim vrstama karcinoma je zajedničko da nastaju od zdravih stanica organizma procesom koji nazivamo zloćudnom pretvorbom. Promjene odgovorne za zloćudnu pretvorbu stanica su uglavnom genske mutacije koje se u manjem broju slučajeva mogu naslijediti, ali najčešće nastaju u somatskim stanicama kao posljedica djelovanja raznih mutagena ili nasumično uslijed pogrešaka pri umnažanju DNA. Klinički se najčešće očituje kao nakupina velikog broja zloćudno preobraženih stanica čiji se broj zbog nekontrolirane stanične diobe progresivno povećava. Međutim, različiti dokazi upućuju na to da je karcinom monoklonalnog podrijetla, što znači da nastaje zloćudnom transformacijom samo jedne zdrave stanice (1).

Deset ključnih obilježja koja su zajednička svim tipovima karcinoma su: samodostatnost s obzirom na signale rasta, neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast, zaobilaženje programirane stanične smrti (apoptoze), neograničen potencijal umnažanja, tumorska angiogeneza, sposobnost tkivne invazije i presađivanja, poremećen metabolizam, sposobnost izbjegavanja imunološkog odgovora, genomska nestabilnost te upala (2).

Karcinom je značajan javnozdravstveni problem u Republici Hrvatskoj. Drugi je najvažniji uzrok smrti nakon bolesti srca i krvnih žila. Podaci o epidemiologiji karcinoma prikupljaju se u Registru za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo i objavljuju se u redovnim biltenima (3).

### 1.1.1 Onkogeni i tumor supresorski geni

Onkogeni su prvi geni za koje se pokazalo da imaju središnju ulogu u nastanku karcinoma. Oni su aktivnija i promijenjena inačica normalnih staničnih gena koje nazivamo proto-onkogenima i koji sudjeluju u regulaciji normalne stanične proliferacije i diferencijacije. Onkogeni se mogu aktivirati zbog mutacija u samom genomu, kao posljedica genske amplifikacije, kao posljedica kromosomske translokacije. Posljedica aktivacije onkogeni jest

nekontrolirani rast i dioba stanice, što uzrokuje nastanak karcinoma. Promjene kojima nastaju onkogeni obično imaju dominantan učinak, tj. potrebna je promjena samo u jednom alelu da bi se očitovao učinak onkogen (4).

Za razliku od onkogen čija pojačana aktivnost dovodi do nastanka raka, tumor supresorski geni jesu geni kod kojih gubitak ili inaktivacija njih samih, odnosno njihovih proteinskih produkata, dovodi do nastanka karcinoma. Mutacije tumor supresorskih gena obično imaju recesivni učinak, odnosno nužna je inaktivacija obaju alela da bi se očitovao njihov učinak. Do inaktivacije tumor supresorskih gena, osim mutacijom, može doći i epigenetički, metilacijom njihovih promotora. Posebno je važan tumor supresorski gen P53. Taj gen često je mutiran u različitim tipovima raka u ljudi. Proteinski produkt gena P53, transkripcijski čimbenik p53, aktivira se zbog oštećenja stanične DNA ili drugih poremećaja povezanih sa staničnim stresom. Aktivirani p53 ima dva osnovna načina djelovanja: zaustavlja stanicu u određenoj fazi staničnog ciklusa i aktivira popravak oštećenja DNA te potiče apoptozu. Oštećenje stanične DNA znatno povećava mogućnost da se stanica pretvori u stanicu karcinoma, osobito ukoliko u stanici nedostaje ili je inaktiviran gen P53 jer tada u diobu ulaze i stanice s oštećenom DNA (4).

## **1.2 KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA**

### **1.2.1 Epidemiologija i etiologija**

Karcinom mokraćnog mjehura je deveti najčešći oblik maligniteta i trinaesti najčešći uzrok smrti od raka širom svijeta (5). U Republici Hrvatskoj je 2015. godine zabilježeno 929 slučajeva raka mokraćnog mjehura. Incidencija karcinoma mokraćnog mjehura iznosi 16,3/100.000. Rak prijelaznog epitela se 3 puta češće javlja u muškaraca (3). Prosječna dob bolesnika s karcinomom mokraćnog mjehura u svijetu iznosi 73 godine. Dokazani čimbenici rizika za nastanak karcinoma mokraćnog mjehura su pušenje, izlaganje aromatskim aminima, azo-bojama, određenim lijekovima (ciklofosamid, fenacetin), postojanje kamenaca, kronična upala te shistosomijaza (6).

### 1.2.2 Patohistologija

Karcinom mokraćnog mjehura najčešće potječe iz prijelaznog (uroelnog) epitela (90%). Ostali patohistološki oblici su karcinom pločastih stanica (3%), adenokarcinom (2%) i karcinom malih stanica (1%). Karcinomi urotela su 50-100 puta češći u mokraćnom mjehuru nego na ostalim dijelovima urotrakta (6).

### 1.2.3 Klinička slika

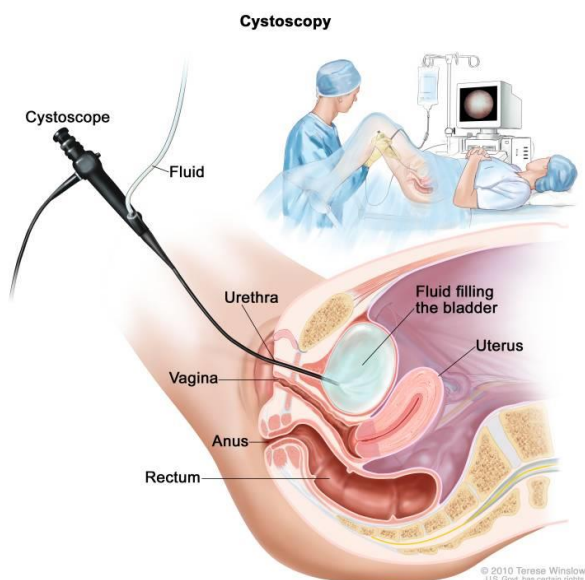
Karcinom mokraćnog mjehura se kod 90% pacijenata očituje bezbolnom hematurijom, mikroskopskom ili makroskopskom. Pojavljuje se učestalo mokrenje zbog smanjenog kapaciteta mjehura ili rjeđe, simptoma urinarne infekcije. Znakovi lokalnog širenja su hidronefroza, opstipacija, limfedem te palpabilna masa u maloj zdjelici. Kod uznapredovale bolesti pojavljuju se simptomi vezani uz sijela presadnica. Urotelni karcinom najčešće metastazira u trbušne limfne čvorove, jetru, pluća i kosti (6).



**Slika 1.** Poprečni presjek mokraćnog mjehura sa metastazama unutar zida rodnice  
(Preuzeto s: [www.medscape.com](http://www.medscape.com))

#### 1.2.4 Dijagnostika

Pojavom hematurije, bolesniku je potrebno napraviti intravensku urografiju te cistoskopiju (Slika 2.). Ako cistoskopija pokaže tumor, potrebno je učiniti transuretralnu resekciju tumora u mjehuru. Za potvrdu dijagnoze tumora gornjeg dijela urotrakta izvode se retrogradna pijelografija te ureteroskopija. Kao pomoć u dijagnostici služi citološki pregled mokraće. Za procjenu proširenosti bolesti koristi se MSCT ili MR abdomena i male zdjelice te RDG prikazom pluća (6).



**Slika 2.** Cistoskopija mokraćnog mjehura

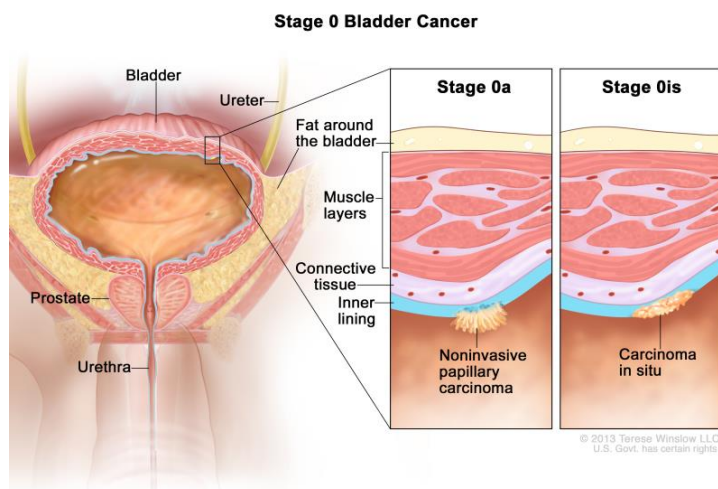
(Preuzeto s: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705\\_\\_116](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116))

### 1.2.5 Klasifikacija tumora

Zbog odgovarajućeg izbora terapije te prognoze bolesti, potrebna je što točnija procjena proširenosti bolesti koja se najčešće izražava TNM klasifikacijom Američkog združenog komiteta za rak (American Joint Committee on Cancer, AJCC) (Tablica 1.) (6)

**Tablica 1.** TNM klasifikacija tumora mokraćnog mjehura (6)

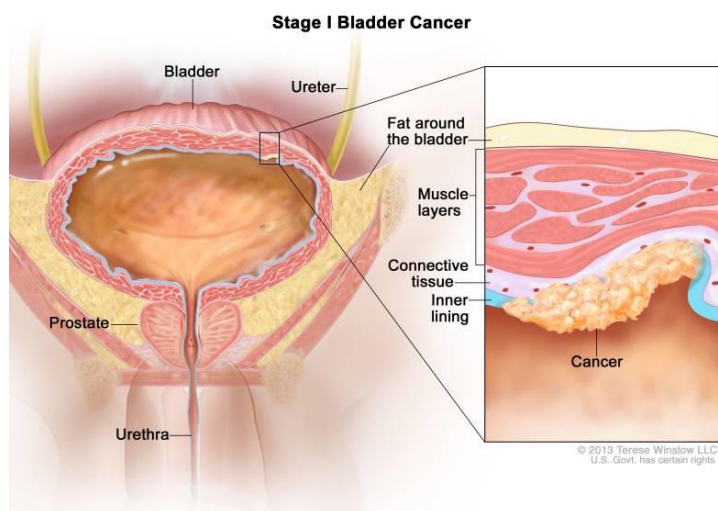
| <b>Primarni tumor (T)</b>      |                                                                                                                              |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tx</b>                      | Primarni tumor se ne može opisati                                                                                            |
| <b>T0</b>                      | Nema dokaza primarnog tumora                                                                                                 |
| <b>Ta</b>                      | neinvazivni papilarni karcinom                                                                                               |
| <b>Tis</b>                     | Karcinom <i>in situ</i> : 'flat tumor'                                                                                       |
| <b>T1</b>                      | Tumor invadira subepitelno vezivno tkivo                                                                                     |
| <b>T2</b>                      | Tumor invadira mišićni sloj                                                                                                  |
| <b>T2a</b>                     | Tumor invadira površinski mišićni sloj (unutarnja polovica)                                                                  |
| <b>T2b</b>                     | Tumor invadira duboki mišićni sloj (vanjska polovica)                                                                        |
| <b>T3</b>                      | Tumor invadira perivezikalno tkivo                                                                                           |
| <b>T3a</b>                     | Mikroskopska invazija perivezikalnog tkiva                                                                                   |
| <b>T3b</b>                     | Makroskopska invazija perivezikalnog tkiva                                                                                   |
| <b>T4</b>                      | Tumor invadira jedno od navedenog: stroma prostate, sjemeni mjehurići, maternica, vagina, zdjelična stjenka, trbušna stjenka |
| <b>T4a</b>                     | Tumor invadira jedno od navedenog: stroma prostate, sjemeni mjehurići, maternica, vagina                                     |
| <b>T4b</b>                     | Tumor invadira zdjeličnu stjenku, trbušnu stjenku                                                                            |
| <b>Limfni čvorovi (N)</b>      |                                                                                                                              |
| <b>Tx</b>                      | Limfni čvorovi ne mogu biti određeni                                                                                         |
| <b>N0</b>                      | Nema zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova                                                                                  |
| <b>N1</b>                      | Jedan zahvaćeni regionalni limfni čvor u zdjelici                                                                            |
| <b>N2</b>                      | Više od jednog zahvaćenog limfnog čvora u zdjelici                                                                           |
| <b>N3</b>                      | Metastaze u zajedničkim ilijačnim limfnim čvorovima                                                                          |
| <b>Udaljene presadnice (M)</b> |                                                                                                                              |
| <b>M0</b>                      | Nema udaljenih presadnica                                                                                                    |
| <b>M1</b>                      | Udaljene presadnice                                                                                                          |



**Slika 3.** Stadij 0 karcinoma mokraćnog mjehura

(Preuzeto s:

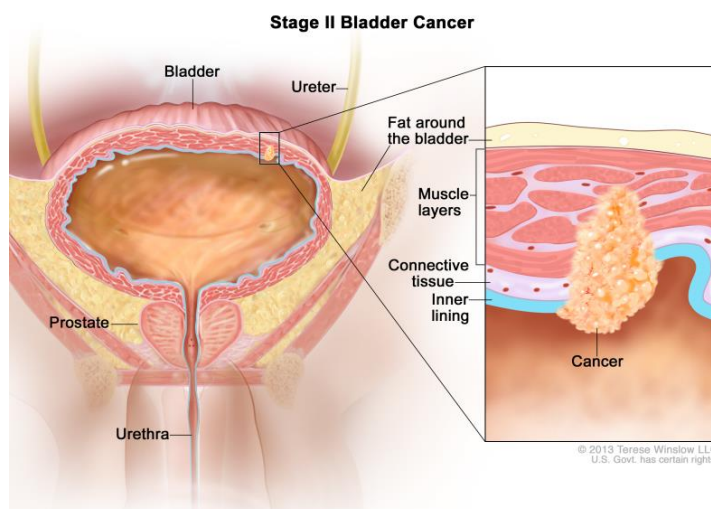
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705\\_116](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705_116))



**Slika 4.** Stadij 1 karcinoma mokraćnog mjehura

(Preuzeto s:

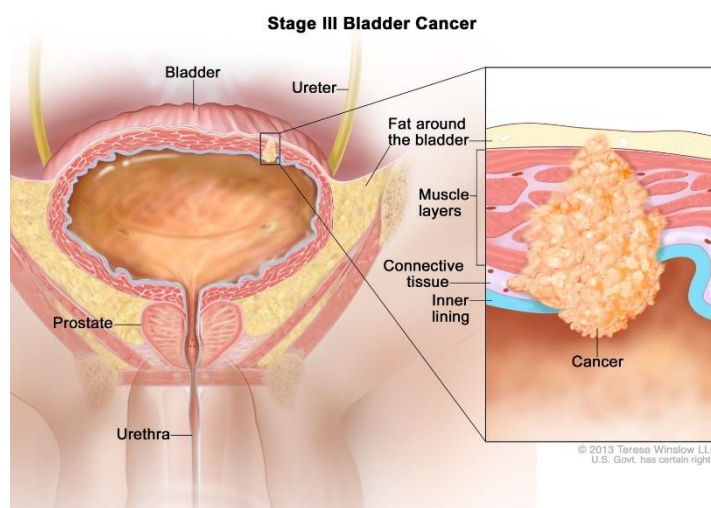
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705\\_116](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705_116))



**Slika 5.** Stadij 2 karcinoma mokraćnog mjehura

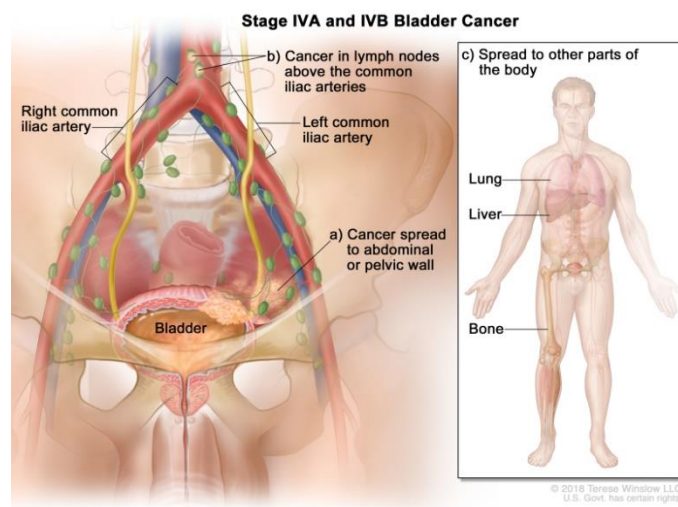
(Preuzeto s:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705\\_116](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705_116))



**Slika 6.** Stadij 3 karcinoma mokraćnog mjehura

Preuzeto s: [https://www.cancer.gov/PublishedContent/Images/news-events/cancer-currents-blog/2017/bladder-cancer-stage-iii-enlarge\\_v200210570.jpg](https://www.cancer.gov/PublishedContent/Images/news-events/cancer-currents-blog/2017/bladder-cancer-stage-iii-enlarge_v200210570.jpg)



**Slika 7.** Stadij 4a/4b karcinoma mokraćnog mjehura

(Preuzeto s:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705\\_\\_116](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032729/#CDR0000062705__116))

### 1.2.6 Liječenje

Liječenje se temelji na stupnju raširenosti bolesti. Stoga se razlikuje pristup neinvazivnom (površinskom) i mišićno-invazivnom karcinomu ili metastatskoj bolesti (6).

Primarni oblik liječenja površinskog raka mokraćnog mjehura je transuretralna endoskopska resekcija (TUR). S obzirom na visoku stopu lokalnog povratka bolesti, nakon resekcija, potrebno je u tromjesečnim intervalima ponavljati cistoskopiju. Adjuvantno se intravezikalno aplicira imunoterapija ili kemoterapija. U imunoterapiji površinskog karcinoma mokraćnog mjehura primjenjuje se BCG (Bacillus Calmette-Guérin), dok se od citostatika najčešće primjenjuje mitomicin C. Rjeđe se primjenjuje doksorubicin. Nakon aplikacije citostatika bolesnik ne mokri jedan sat te hoda, kako bi se zadržao kontakt lijeka s endotelom. Intravezikalna imunoterapija i kemoterapija produljuju preživljenje bez znakova bolesti te smanjuju broj recidiva (6).

Osnovni oblik liječenja invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura jest radikalna cistektomija, s neoadjuvantnom kemoterapijom temeljenom na cisplatini. Primjena adjuvantne kemoterapije ovisno o patohistološkoj slici tumora, statusu regionalnih limfnih čvorova i stadiju bolesti. Rjeđe se primjenjuje parcijalna cistektomija. U izabranih se bolesnika može provesti

konkomitantna kemoiradijacija (usporedna aplikacija radioterapije i kemoterapije temeljene na cisplatinu) u svrhu očuvanja mokraćnog mjehura. Bolesnici koji zbog općeg stanja ili znatnog komorbiditeta ne mogu tolerirati kemoradioterapiju, samo se zrače. Metastatska se bolest liječi kemoterapijom i imunoterapijom. Od citostatika rabe se cisplatin, metotreksat, doksorubicin, vinblastin, gemcitabin i paklitaksel. Danas je standardna prvolinijska terapija kombinacija cisplatine i gemcitabina. Za pacijente koji ne mogu podnijeti liječenje cisplatinom u 1. liniju liječenja može se primijeniti imunoterapija atezolizumabom ili pembrolizumabom. U 2. liniji liječenja anti-PD1 ili anti-PDL1 imunoterapija je preferirana terapijska opcija pred citostatskom terapijom (vinflunin, taksani) (6).

### 1.3 KUPUSNJAČE

Kupusnjače ili krstašice (*Brassicaceae*, prethodno *Cruciferae*), porodica su cvjetnica (red *Brassicales*) i sadrže 338 rodova i oko 3700 vrsta. Porodica uključuje mnoge ekonomski važne biljke koje su dosta promijenjene i udomaćene od strane ljudi, posebno one roda *Brassica*, koji uključuje kupus, brokulu, prokulice, kelj, korabu, kinesko zelje, repu i hibridnu repu. Drugi važni poljoprivredni usjevi porodice su hren, rotkvica i bijeli senf. Određeni broj vrsta, kao što su ognjica, jednogodišnja mjesečnica i Arduinova gromotulja, se uzgajaju kao ukrasne biljke, a neke se smatraju invazivnim vrstama u područjima nespecifičnim za njihov rast (7).

Biljke iz porodice krstašica su uglavnom zeljaste i mogu biti jednogodišnje, dvogodišnje ili trajnice. Listovi su jednostavni i naizmjenično raspoređeni, a mnogi imaju papreni okus. Cvjetovi su križni s četiri latice i četiri lapa, obično bijeli, žuti ili boje lavande. Karakteristična su četiri duga i dva kratka prašnika te dvodijelni tučak smješten iznad ostalih biljnih dijelova. Sjemenke se proizvode u suhim plodovima, često s pregradom između polovica. Dugi, tanki plodovi poznati su kao komuške, a kratki zaobljeni kao komušćice. *Brassica oleracea* uzgaja se više od 2000 godina te su razvijeni raznoliki oblici biljaka. Iako se u općem izgledu razlikuju, kupus, kelj, koraba, cvjetača, brokula i prokulice su sve kultivari vrste *Brassicca oleracea*. *Brassicca oleracea* je član porodice kupusa (*Brassicaceae*) koja uključuje i repu (*Brassica rapa*) i rotkvicu (*Raphanus sativus*), a zajednički naziv kupusnjače potiče od francuske riječi *caboche* koja znači „glava“ (7). Biljke porodice *Brassicaceae* bogat su izvor spojeva koji sadrže sumpor, glukozinolati. S obzirom na strukturne sličnosti bočnog lanca, glukozinolati se mogu podijeliti na alifatske, aromatske i heterocikličke (indolne) glukozinolati (8).

Izotiocijanati su biološki aktivni produkti hidrolize glukozinolata. Kupusnjače sadrže razne glukozinolate, hidrolizom svaki od njih formira različite izotiocijanate. Primjerice brokula je dobar izvor glukorafanina, glukozinolatnog prekursora sulforafana (SFN) i sinigrina, glukozinolatnog prekursora alil izotiocijanata (AITC), potočarka je bogat izvor glukonasturtina, prekursora feniletil izotiocijanata (PEITC), a vrtna salata je bogata glukotropeolinom, prekursorom benzil izotiocijanata (BITC). Apsorpcija i ekskrecija izotiocijanata ovisi o načinu konzumiranja kupusnjača, znatno je niža iz kuhanih nego iz svježih kupusnjača. Žvakanje ili sjeckanje kupusnjača povećava kontakt između glukozinolata i biljne mirozinaze, te se povećava količina apsorbiranih izotiocijanata. Mirozinaza je razred enzima koji kataliziraju hidrolizu glukozinolata i fizički je odvojena od glukozinolata u netaknutoj biljnoj stanici (9). Biološke aktivnosti glukozinolata su raznolike. Modulacija signalnih puteva Nrf2 i NF- $\kappa$ B posebno je važna za prevenciju karcinoma jer i oksidativni stres i upala značajno doprinose razvoju i progresiji karcinoma. Na različitim životinjskim modelima potvrđeno je da neki prirodni izotiocijanati i njihovi metaboliti inhibiraju razvoj kemijski induciranih karcinoma pluća, jetre, jednjaka, želudca, tankog i debelog crijeva te dojke (9).

### 1.3.1 *Allium neapolitanum* Cirillo

*Allium neapolitanum* Cirillo (lat. *Allium* - češnjak, *neapolitanum* - napuljski) je višegodišnja biljka iz roda *Allium*. *Allium neapolitanum* Cirillo raste na području Mediterana, od Portugala do Izraela, na pašnjacima, kultiviranom zemljištu i suhim otvorenim staništima. Narodna imena su napuljski luk, mliječni luk i bijeli luk. Reproducira se preko sjemenki i lukovica koje se nalaze u tlu, prisutne u većem broju, promjera obično 1 do 2.5 cm. Listovi su linearni, šiljastog kuta, voštani, plavo-zelene boje. Iz zemlje izlaze u skupinama od 2 do 6. Cvijeće je oblika labavog kišobrana na vrhu 20 do 70 cm visoke stabljike. Bijeli cvjetovi se razgranjuju iz stabljike u obliku globusa (10).



**Slika 8.** *Allium neapolitanum* Cirillo, izgled  
(Preuzeto s:

[http://plantillustrations.org/illustration.php?id\\_illustration=38136&SID=0&mobile=0&code\\_category\\_taxon=9&size=1](http://plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=38136&SID=0&mobile=0&code_category_taxon=9&size=1))

Mehaničkom obradom biljke se javlja karakterističan okus i miris, zbog djelovanja enzima aliinaze. Aliinaza je u netaknutom dijelu biljke raspoređena unutar biljnih vakuola. S-alk(en)il cistein sulfoksid nalazi se u citoplazmi. Nakon oštećenja tkiva, vakuolski i citoplazmatski sadržaj se miješa, odvija se enzimaska hidroliza odgovarajućih nehlapljivih S-alk(en)il cistein sulfoksida i stvaraju se reaktivni, hlapljivi sumporovi spojevi, tiosulfinati (11). Fitokemijske studije o sastavu *A. neapolitanum* dovode do izolacije trinaest flavonoid glikozida baziranih na kamforu, kvercetinu i isorhamnetinu i dva ksantin alkaloida s antibakterijskom aktivnošću. Potvrđena su i antioksidativna svojstva vodenih ekstrakata lukovica, listova i cvjetova *A. neapolitanum*. Vodeni ekstrakt lukovica pokazuje jako dobar antihipertenzivni učinak, dok kloroformski ekstrakt pokazuje antimikrobnu aktivnost na nekoliko bakterija i *C. albicans*, čak bolju nego streptomycin sulfat i nistatin (12). Hidrodestilat nadzemnih dijelova biljke *A. neapolitanum* daje ulje žute boje u kojem je identificirano devetnaest spojeva, što predstavlja 96,8 % ukupnog broja spojeva. Najmnogobrojnija skupina su oksigenirani monoterpeni, dok kao pojedinačnih spojeva najviše ima (E)-krisantenol acetata, (Z)-krisantenol acetata i kamfora. Među spojevima koji sadrže sumpor u izobilju ima dimetil trisulfida, metil-3-alil trisulfida te metil alil disulfida. Jedini detektirani seskviterpen u ulju je farnesen. Antimikrobna i antifungalna aktivnost eteričnog ulja testirana je na ploči koja uključuje osam

vrsta bakterija, odabrana kao reprezentativna skupina gram pozitivnih i gram negativnih, jednog kvasca i dvije vrste plijesni. Ulje je pokazalo dobru antimikrobnu aktivnost posebno protiv *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Fusarium oxysporum* i *Aspergillus niger*. Dobra antimikrobna aktivnost ulja pripisuje se prisutnosti kamfora, dimetil trisulfida, metil alil disulfida i 1-metil-3-alil trisulfida. Antimikrobna aktivnost protiv gore navedenih mikroorganizama, koji su glavni nametnici arhiva, knjižnica i povijesnih celuloznih tekstilnih predmeta prilično često čini ovu biljku zanimljivo za moguće primjene u zaštiti i dezinfekciji muzejskih objekata (12).

### 1.3.2 *Bunias erucago* L.

*Bunias erucago* L. (Čunjasti repušac) je jednogodišnja ili dvogodišnja zeljasta biljka uspravne stabljike koja može narasti do 60 cm visine. Pripada porodici kupusnjača. Stabljika je uspravna, prekrivena dlakama i razgranata, u donjem dijelu hrapava i ljubičaste nijanse. Na peteljka se nalaze duguljasti, perasto razdijeljeni listovi, tupo nazubljenih rubova. Žuti, dvospolni cvjetovi, veličina cca 1 cm su pozicionirani na dužim stapkama na vrhu stabljika, skupljeni u rahle grozdaste cvatove. Vjenčić čine 4 žute latice i 6 prašnika. Plodovi nepravilnog oblika sadrže sjemenke u 3-4 odjeljka, a vrijeme dozrijevanja je od srpnja do rujna. Velika rasprostranjenost je u južnoj Europi, dok je u Republici Hrvatskoj pronađena samo u primorskom području. Raste na sunčanim i suhim staništima, uz puteve i suhe livade te neobrađena i siromašna zemljišta. Jestivi dijelovi biljke su mladi izdanci i listovi i to kuhani ili u sirovom obliku, a u sirovom obliku i korijen (13).

Samo su dvije priznate vrste roda *Bunias* čija je genetska raznolikost proučavana. Proučavanjem sjemeni *Bunias orientalis* dokazana je prisutnost glukorafanina, glukorafenina, glukosinalbina i glukoputranjivina, pri čemu dominira prisutnost glukosinalbina i glukorafenina. GC-MS analizom korijena, stabljika i lišća te cvijeta *Bunias erucago* L. potvrđeno je kako su glukozinolati u ovoj biljci samo u tragovima, dok prisustvo izotiocijanata nije uopće detektirano. Korijen s drugog lokaliteta je najbogatiji dio biljke hlapljivim spojevima koji potječu od glukozinolata ili S-metil-L-cistein sulfoksida (14).



**Slika 9.** *Bunias erucago* L., izgled

(Preuzeto s:

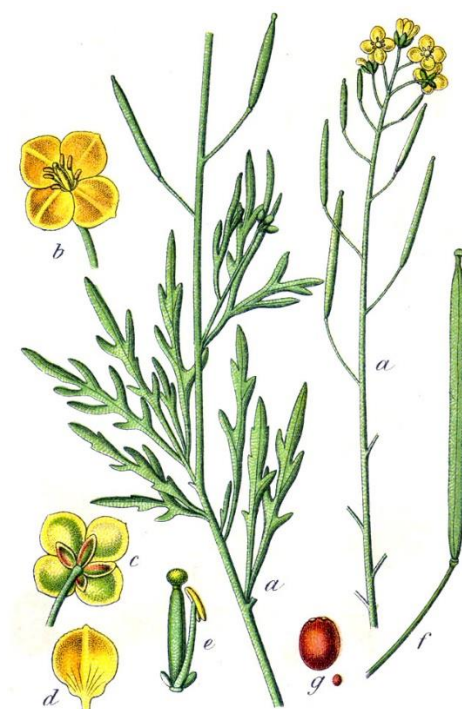
[http://plantillustrations.org/illustration.php?id\\_illustration=139726&SID=iojkrqtq7q7bm9fd5g5d84obb0&mobile=1&code\\_category\\_taxon=9&size=0](http://plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=139726&SID=iojkrqtq7q7bm9fd5g5d84obb0&mobile=1&code_category_taxon=9&size=0))

### 1.3.3 *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC

*Diplotaxis tenuifolia* (L.) (Uskolisni dvoredac) je biljka koja pripada porodici kupusnjača (*Brassicaceae*). Latinsko ime roda potječe od riječi *diploous* (dvostruk) i *taxis* (red), a ime vrste od latinskih riječi *tener* (nježan, mekan) i *folium* (list). Trajna je zeljasta biljka, uspravne razgranate stabljike koja može narasti do 60 cm visine. Poput stabljike je i korijen jako razgranat i snažan. Duguljasti, plavozeleni, duboko perasti listovi razdijeljeni su na uske režnjeve i kada se protrljaju razvijaju intenzivan miris. Na dugim stapkama, skupljeni u grozdaste cvatove nalaze se mirisni cvjetovi jarko žute boje. Dvostrukog su ocvijeća, četiri okruglaste latice vjenčića dvostruko su duže od lapova čaške. Vrijeme cvatnje je od lipnja do listopada, izvor su nektara za pčele. Plod je duga komuška veličine 3 cm unutar koje se nalazi mnogo sitnih sjemenki, smještenih u dva reda. Pogoduju joj kamenita, šljunkovita i pješčana staništa, najčešće raste uz puteve, obale rijeka, blizu željezničkih pruga. Rasprostranjena je u srednjoj i južnoj Europi, zapadnoj Aziji te sjevernoj Africi u nizinskom području do 1000m nadmorske visine. Jestivi dio biljke su listovi koji mirisom podsjećaju na rikolu (*Eruca sativa*),

beru se u proljeće i rano ljeto. Bogati su vitaminom C i karotinom, izraženog su mirisa i ljutkasto-paprenog okusa. Sjemenke se mogu koristiti u izradi senfa (15).

*Diplotaxis tenuifolia* (L.) pripada grupi biljaka koje se nazivaju „raketa“ (eng. *rocket*) koja pripada porodici *Brassicaceae* i prirodno nastanjuju područje Mediterana. Različite provedene studije naglašavaju kako je ova skupina biljaka bogat izvor glukozinolata. Upravo glukozinolati i njihovi hidrolizirani metaboliti daju karakteristične arome i okuse, a hlapljive tvari, poput izotiocijanata, su povezane sa antitumorskom aktivnošću ovih biljaka (16).



**Slika 10.** *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC, izgled  
(Preuzeto i modificirano s: <http://www.biolib.de/>)

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja je utvrditi citotoksično djelovanje ekstrakata određenih dijelova biljke od odabranih biljaka iz porodice kupusnjača (*Brassicaceae*) na staničnim linijama karcinoma mokraćnog mjehura T24 i TCCSUP.

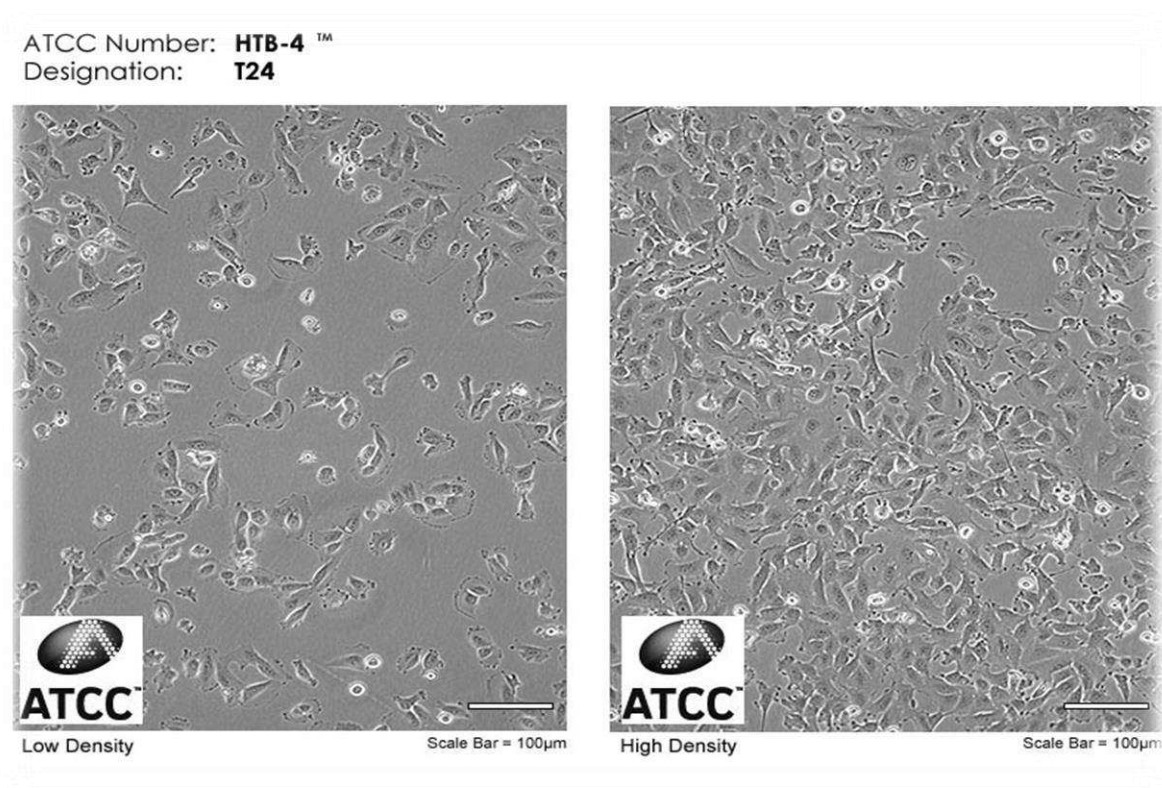
### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1 STANIČNE LINIJE

*In vitro* istraživanje ispitivanja djelovanja određenih biljaka iz porodice kupusnjača se provodilo na karcinomskim stanicama T24 i TCCSUP. Obilježja tih staničnih linija su prikazana u tablicama.

**Tablica 2.** Obilježja T24 stanične linije (preuzeto s <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-4.aspx> )

|                          |                              |
|--------------------------|------------------------------|
| <b>Organizam</b>         | <i>Homo sapiens</i> , čovjek |
| <b>Tkivo</b>             | mokraćni mjehur              |
| <b>Forma proizvoda</b>   | smrznuto                     |
| <b>Morfologija</b>       | epitelna                     |
| <b>Obilježje kulture</b> | adherentna                   |
| <b>Bolest</b>            | karcinom prijelaznih stanica |
| <b>Dob i spol</b>        | 81 godina, žena              |

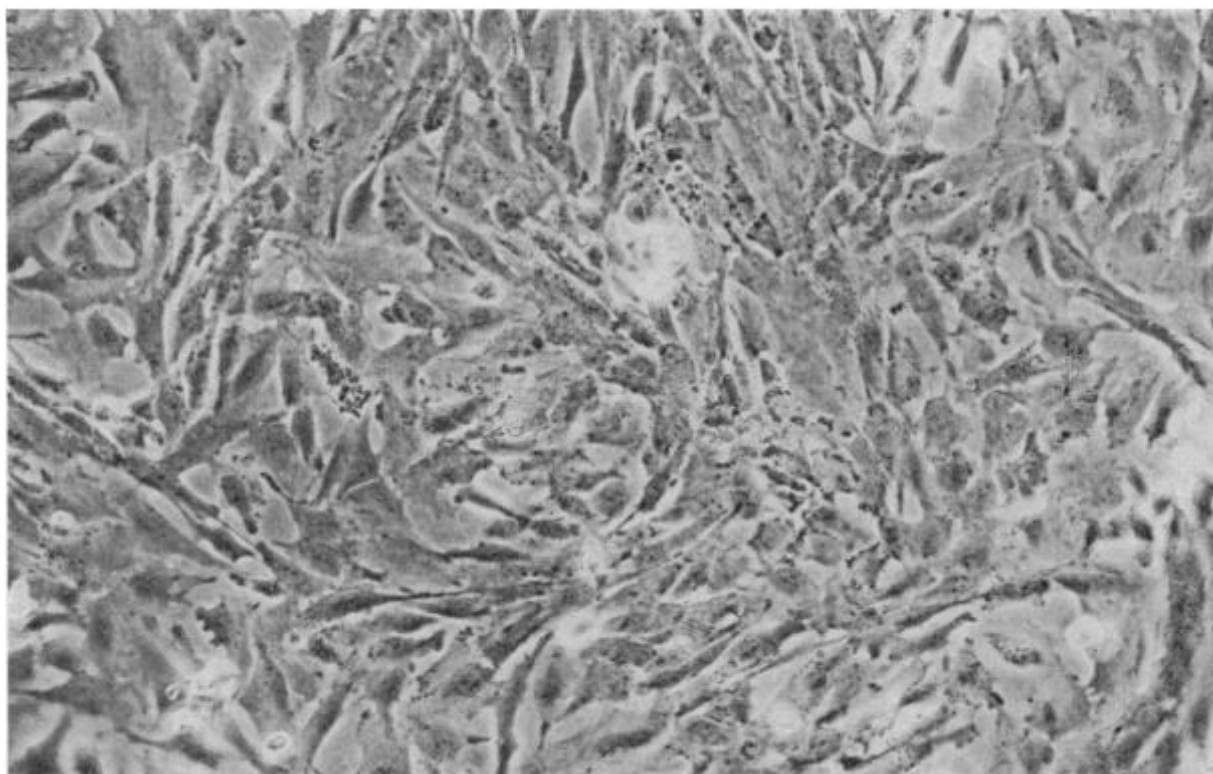


**Slika 11.** Karcinomske stanice T24 stanične linije

Preuzeto s <https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/9/C/2/6/25933.ashx>

**Tablica 3.** Obilježja TCCSUP stanične linije (preuzeto s <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-5.aspx#generalinformation>)

|                          |                                         |
|--------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Organizam</b>         | <i>Homo sapiens</i> , čovjek            |
| <b>Tkivo</b>             | mokraćni mjehur                         |
| <b>Forma proizvoda</b>   | smrznuto                                |
| <b>Morfologija</b>       | epitelna                                |
| <b>Obilježje kulture</b> | adherentna                              |
| <b>Bolest</b>            | karcinom prijelaznih stanica, IV stadij |
| <b>Dob i spol</b>        | 67 godina, žena                         |



**Slika 12.** Karcinomske stanice TCCSUP stanične linije

(preuzeto i modificirano s: <http://images.biomedsearch.com/836756/brjcancer00299-0012.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIBOKHYOLP4MBMRGQ&Expires=1530057600&Signature=ApMA%2Fv0ctSlw2EuvfMMrDFK5swo%3D> )

## 3.2 BILJNI MATERIJALI

### 3.2.1 *Allium neapolitanum* Cirillo

**Tablica 4.** Taksonomija *Allium neapolitanum* Cirillo (17)

|                      |                                                                                                                                                                            |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Red</b>           | Asparagales                                                                                                                                                                |
| <b>Porodica</b>      | <i>Amaryllidaceae</i> (sunovratke(Hr), Schlosser, J.C.K.; Vukotinović, Lj., sunovrati (Hr), Horvatić, S.)                                                                  |
| <b>Rod</b>           | <i>Allium</i> (luk (Hr), Domac, R.)                                                                                                                                        |
| <b>Vrsta</b>         | <i>Allium neapolitanum</i> Cirillo                                                                                                                                         |
| <b>Sinonimi</b>      | <i>Allium album</i> Santi<br><i>Allium candidissimum</i> Cav.<br><i>Allium lacteum</i> Sibth. et Sm.<br><i>Allium neapolitanum</i> var. <i>angustifolium</i> Täckh. & Dror |
| <b>Narodna imena</b> | napuljski luk (Hr), Domac, R.<br>mliječni luk (Hr), Radić, J.<br>bijeli luk (Hr), Radić, J.                                                                                |

Biljni materijal je sabran početkom travnja 2017. godine na području Marjana u gradu Splitu. Ubrzo nakon sabiranja materijala, biljka je pripremljena za izolaciju eteričnog ulja. Svježi biljni materijal podijeljen je na tri dijela: lukovicu, cvijet, stabljiku i list te ostavljen u vodi 48 sati pri sobnoj temperaturi ( $T_{\text{prostorije}} = 24^{\circ}\text{C}$ ) da se autolizira. Nakon toga podvrgnut je hidrodestilaciji u aparaturi po Clevengeru 2.5h za izolaciju hlapljivih sumporovih spojeva, točnije miješanjem polisulfida cijepanjem nehlapljivog prekursora *S*-alk(en)il-cistein sulfoksida.

### 3.2.2 *Bunias erucago* L.

**Tablica 5.** Taksonomija *Bunias erucago* L. (18)

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Red</b>           | Brassicales Bromhead                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Porodica</b>      | <i>Brassicaceae</i> (krstašice (Hr), Schlosser, J.C.K.; Vukotinović, Lj. )                                                                                                                                                                                          |
| <b>Rod</b>           | <i>Bunias</i> (repušac (Hr) Domac, R. )                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Vrsta</b>         | <i>Bunias erucago</i> L.                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>Sinonimi</b>      | <i>Bunias arvensis</i> Jord.<br><i>Bunias aspera</i> Retz.<br><i>Bunias tricornis</i> Lange                                                                                                                                                                         |
| <b>Narodna imena</b> | čunjasti repušac (Hr), Domac, R.,<br>pakolec (Hr), Šulek, B.,<br>repušac verugana (Hr), Schlosser, J.C.K.;<br>Vukotinović, Lj.,<br>repušac hrapava (Hr), Schlosser, J.C.K.;<br>Vukotinović, Lj.,<br>repušac velekrilna (Hr), Schlosser, J.C.K.;<br>Vukotinović, Lj. |

Čunjasti repušac sabran je početkom travnja 2017. godine na Marjanu, na području grada Splita. Nakon sušenja biljka je podijeljena na dijelove: korijen, stabljika, i list te cvijet. Svaki dio pojedinačno je samljeven kako bi došlo do oštećenja biljnih stanica i oslobođenja enzima mirozinaze odgovornog za hidrolizu glukozinolata na hlapljive sumporove spojeve (izotiocijanate i nitrile). Eterično ulje dobiveno je hidrodestilacijom biljnog materijala u aparaturi po Clevengeru 2.5h.

### 3.2.3 *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC

**Tablica 6.** Taksonomija *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC (19)

|                      |                                                                                                                                                                                                   |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Red</b>           | Brassicales Bromhead                                                                                                                                                                              |
| <b>Porodica</b>      | <i>Brassicaceae</i> (krstašice (Hr), Schlosser, J. C. K., Vukotinović, Lj. )                                                                                                                      |
| <b>Rod</b>           | <i>Diplotaxis</i> (dvoredac (Hr), Domac, R.)                                                                                                                                                      |
| <b>Vrsta</b>         | <i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.) DC                                                                                                                                                              |
| <b>Sinonimi</b>      | <i>Eruca murale</i> (Huds. et Curtis) P. Gaertn., B. Mey. et Scherb.<br><i>Eruca tenuifolia</i> (L.) Moench                                                                                       |
| <b>Narodna imena</b> | uskolisni dvoredac (Hr), Domac, R.<br>riga divja (Hr), Šulek, B.<br>rikula divja (Hr), Šulek, B.<br>razgranjeni dvoredac (Hr), Šimić, F.<br>divlja riga (Hr), Šimić, F.<br>rikula (Hr), Šimić, F. |

Uskolisni dvoredac sabran je u listopadu 2017. godine na području grada Splita. Biljni materijal je podijeljen na dva dijela: nadzemni dio i korijen. Jedan dio svježeg nadzemnog dijela koji je sadržavao listove, cvjetove, stabljiku i komuške je usitnjen i podvrgnut hidrodestilaciji po aparaturi po Clevengeru 2.5h.

### 3.3 POSTUPAK

Nakon odmrzavanja stanične linije su uzgojene u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mediju u vlažnom inkubatoru na temperaturi 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>. DMEM medij sadrži FBS (goveđi serum), potrebne hranjive tvari kao što su aminokiseline i minerali, te antibiotike i Red fenol indikator koji promjenom boje u žutu ukazuje da je medij potrebno promijeniti.

Adherirane stanice, nakon uklanjanja DMEM-a, odvojene su od podloge enzimom tripsinom.

Brojanje stanica odvija se tako da se 10 µl stanica pomiješa s 90 µl Trypan Blue boje koja oboji mrtve stanice i omogućava brojenje živih stanica koje nisu obojane. Zatim se jednak broj stanica presađuje u 96 jažica u 3 replikata te se ostave preko noći da se prihvate za podlogu.

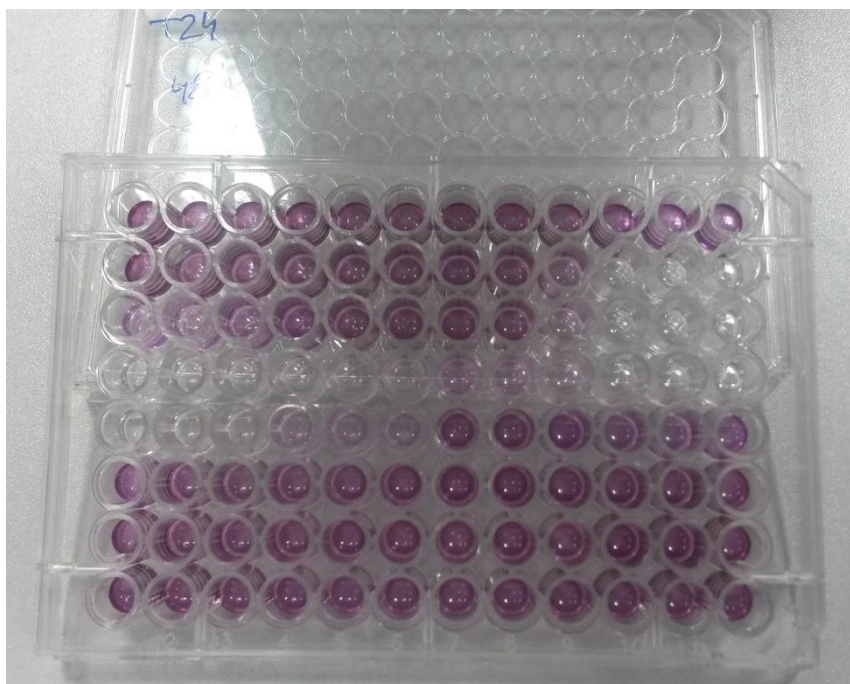
U sljedećem koraku stanice karcinoma tretiraju se prethodno pripremljenim vodenim otopinama izolata kupusnjača u koncentracijama 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Šest jažica koje predstavljaju kontrolu su ostavljene u samom mediju te u njih nisu dodani izolati kupusnjača.



**Slika 13.** Vlažni inkubator za uzgoj stanica (Preuzeto s: <http://www.nuve.com.tr/>)

### 3.4 TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI

Živost i proliferacija stanice određena je mjerenjem staničnog metabolizma koristeći MTT metodu. MTT (3-(4,5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) je prah žute boje koji se pripremi otapanjem u fosfatnom puferu (PBS). U metabolički aktivnim stanicama se reducira, dok ga metabolički neaktivne stanice ne vežu. Metabolički aktivne stanice pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan. Odumrle stanice nemaju sposobnost pretvorbe MTT-a. Mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a. Novonastali unutarstanični ljubičasti spoj se može mjeriti spektrofotometrijski, a da bi se mogla očitati apsorbancija potrebno ga je otopiti u otopini DMSO (dimetil sulfoksid). Sat vremena nakon što se doda MTT, supernatant se odsiše i doda se DMSO. Pločice su inkubirane na 37°C uz treskanje tijekom 10 minuta. Apsorbancija je mjerena na 570 nm.



**Slika 13.** Ljubičasto obojenje nakon dodatka DMSO

Omjer apsorbancije stanica tretiranih vodenim otopinama hlapljivih sumporovih spojeva te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih dijelova biljaka.

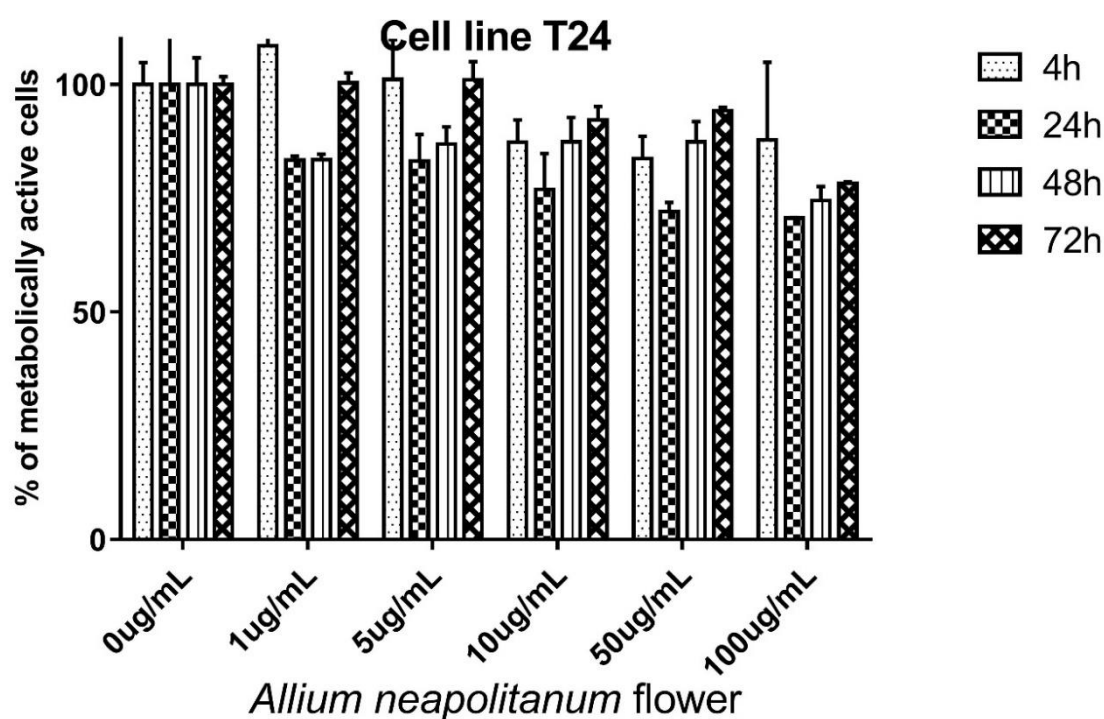
## **4. REZULTATI**

## Empirijska obrada:

Kao ograničenje uzima se premala serija podataka.

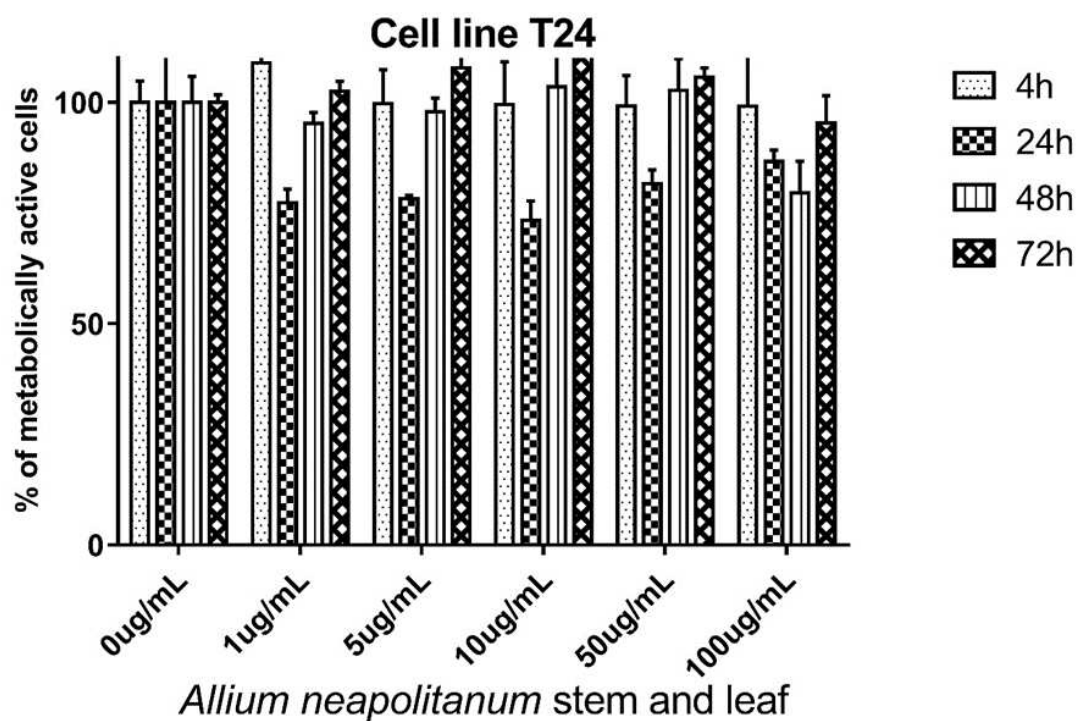
### 4.1. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA- STANIČNA LINIJA T24

#### 4.1.1 *Allium neapolitanum* cvijet



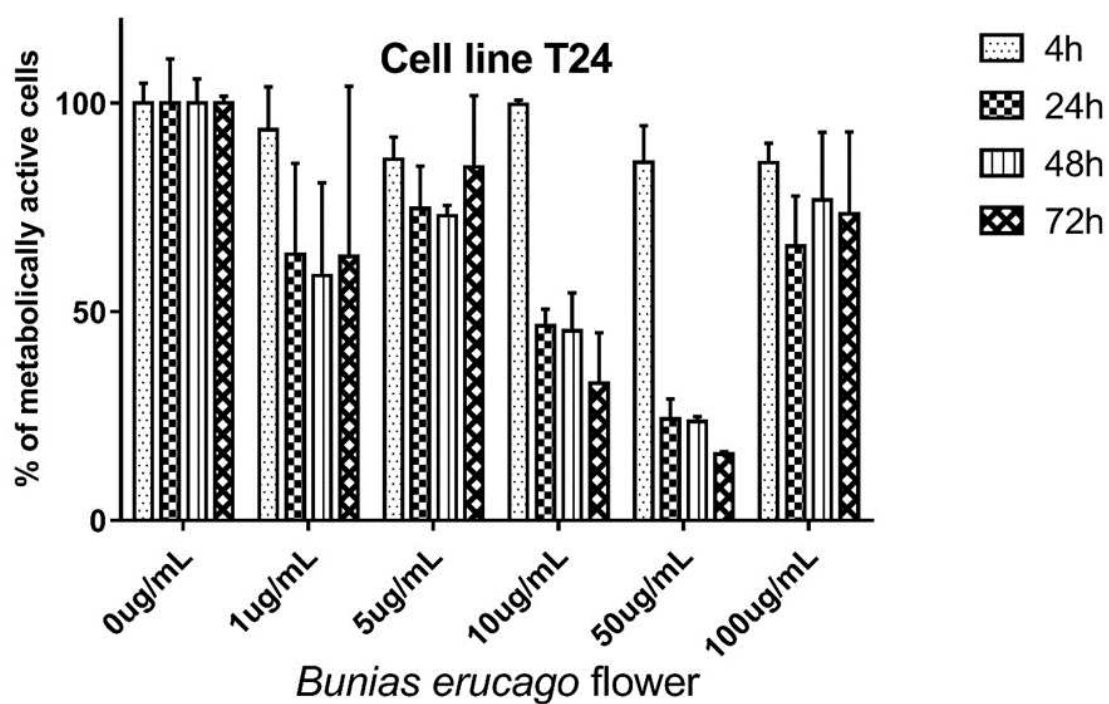
**Slika 14.** Ekstrakt iz *Allium neapolitanum* cvijet ostvaruje značajan učinak pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 24h. Daljnjom inkubacijom dolazi do blagog oporavka stanica.

#### 4.1.2 *Allium neapolitanum* stabljika + list



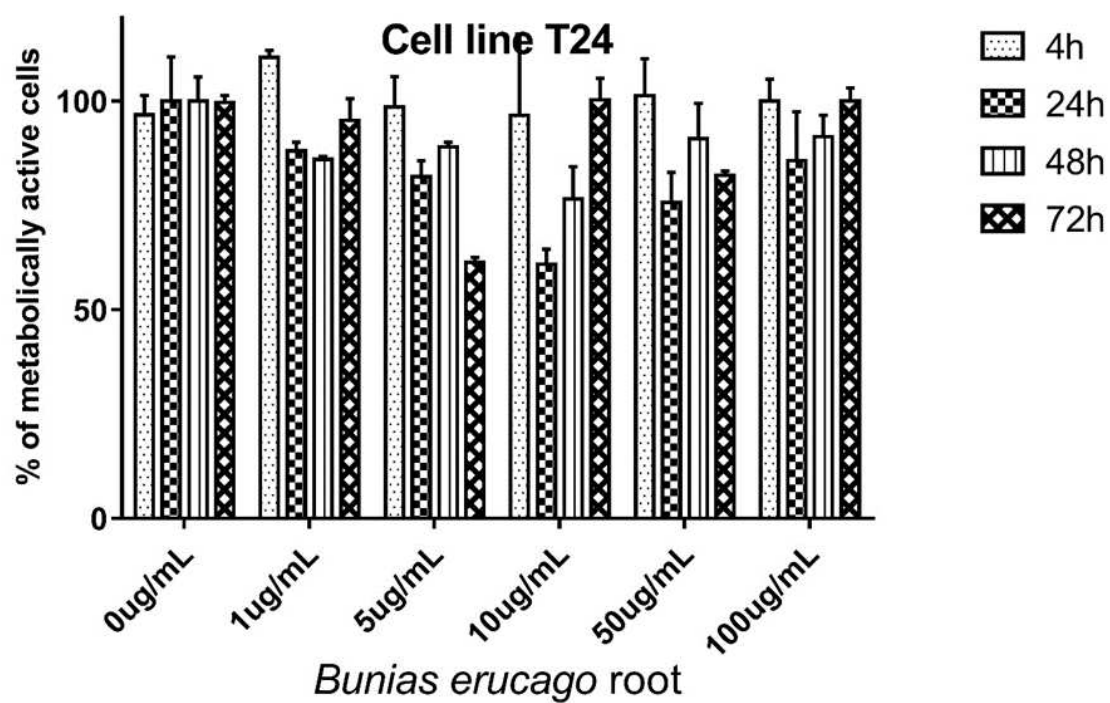
**Slika 15.** Ekstrakt iz *Allium neapolitanum* stabljika + list ostvaruje najbolji učinak pri koncentraciji od 10 µg/mL nakon 24h i pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 48h. Daljnjom inkubacijom dolazi do lagog oporavka stanica.

#### 4.1.3 *Bunias erucago* cvijet



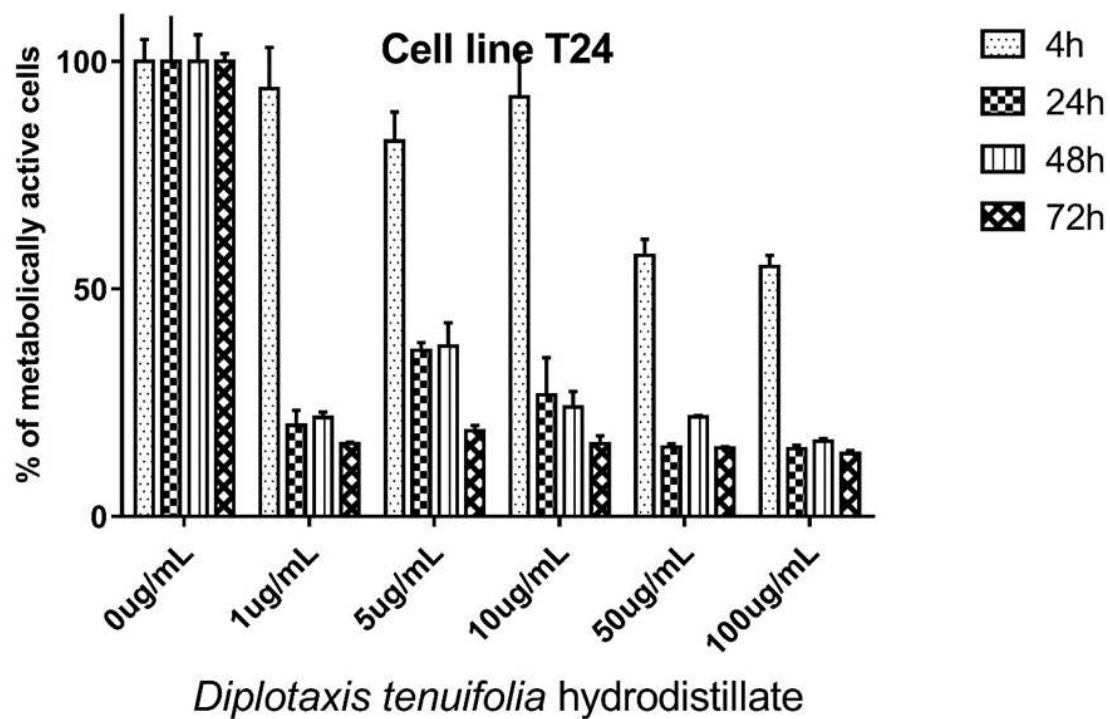
**Slika 16.** Ekstrakt iz *Bunias erucago* cvijet ostvaruje značajan učinak već pri koncentracijama od 1 µg/mL i 5 µg/mL već nakon 24h. Najbolji učinak se ostvaruje pri koncentraciji od 50 µg/mL nakon 24h, koji još raste daljnjom inkubacijom.

#### 4.1.4 *Bunias erucago* korijen



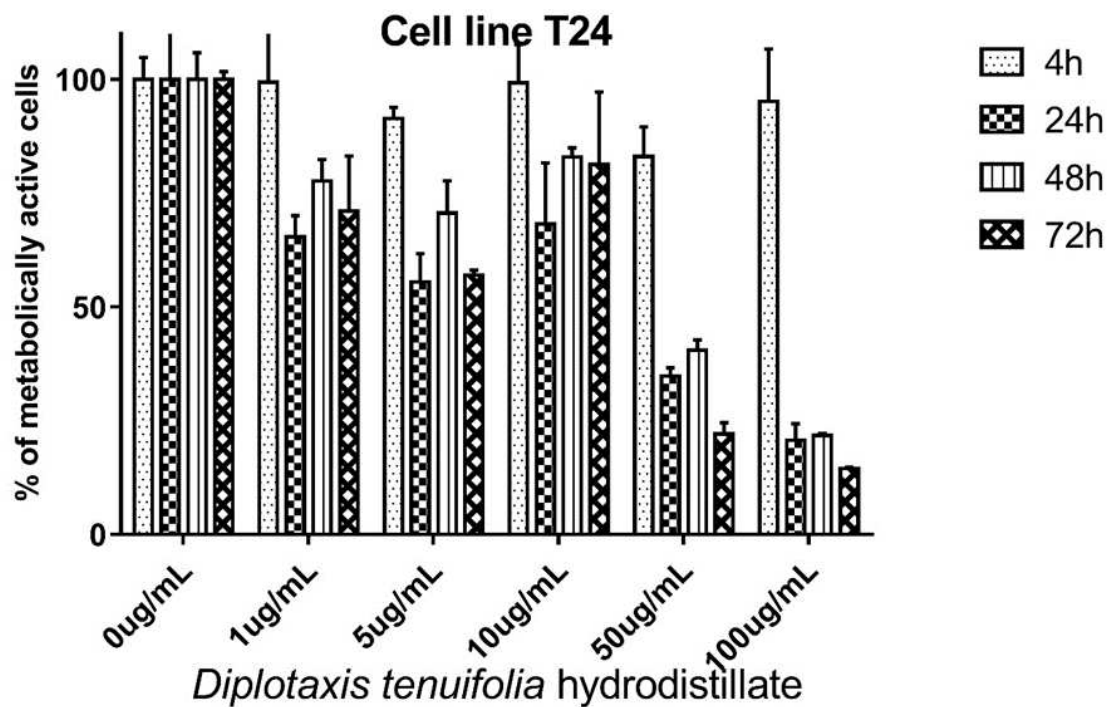
**Slika 17.** Ekstrakt iz *Bunias erucago* korijen pokazuje najveću učinkovitost pri koncentracijama od 5 µg/mL nakon 72h i 10 µg/mL nakon 24h.

#### 4.1.5 *Diplotaxis tenuifolia* hidrodestilat



**Slika 18.** Hidrodestilat *Diplotaxis tenuifolia* pokazuje značajan učinak već pri koncentraciji od 1 µg/mL nakon 24h. Daljnjom inkubacijom broj metabolički aktivnih stanica se smanjuje pri svim koncentracijama.

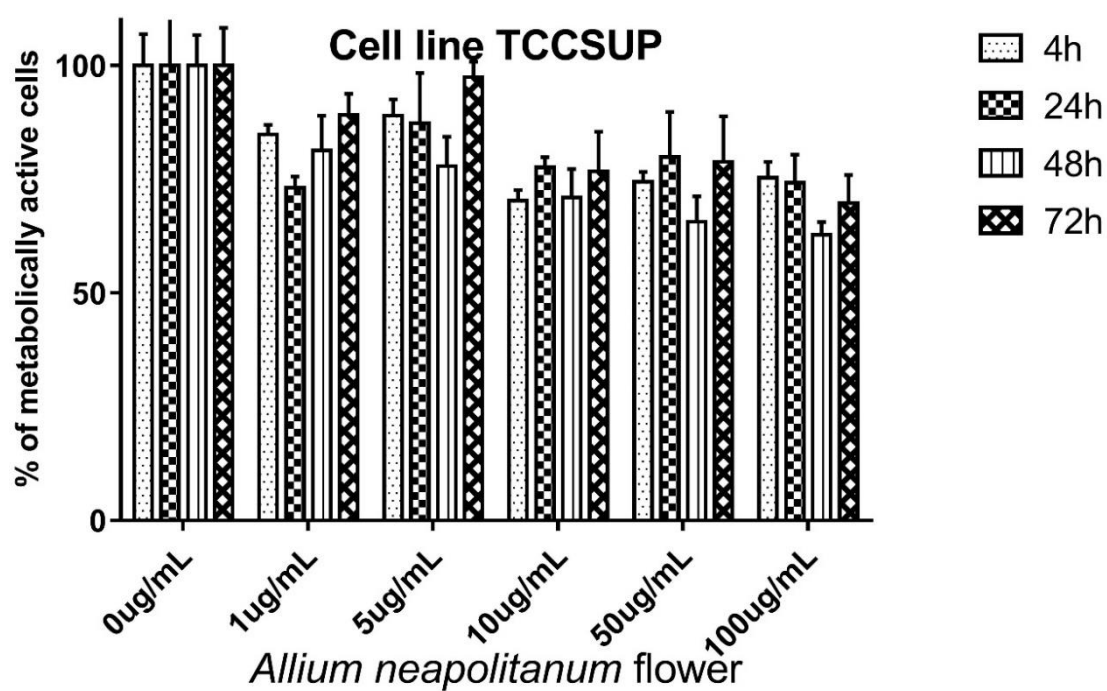
#### 4.1.6 *Diplotaxis tenuifolia* mikrovalni ekstrakt



**Slika 19.** Mikrovalni ekstrakt *Diplotaxis tenuifolia* značajan učinak ostvaruje pri koncentracijama od 1 µg/mL, 5 µg/mL 10 µg/mL nakon 24h. Najbolji učinak je ostvaren pri koncentracijama 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 72h.

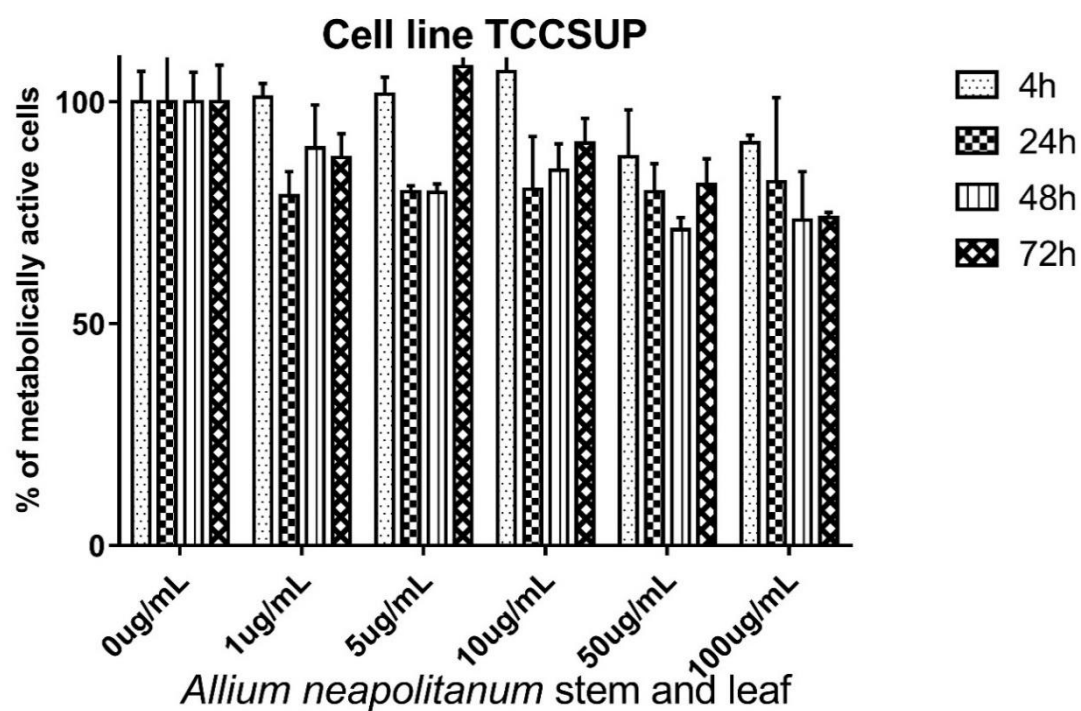
## 4.2 KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA – STANIČNA LINIJA TCCSUP

### 4.2.1 *Allium neapolitanum* cvijet



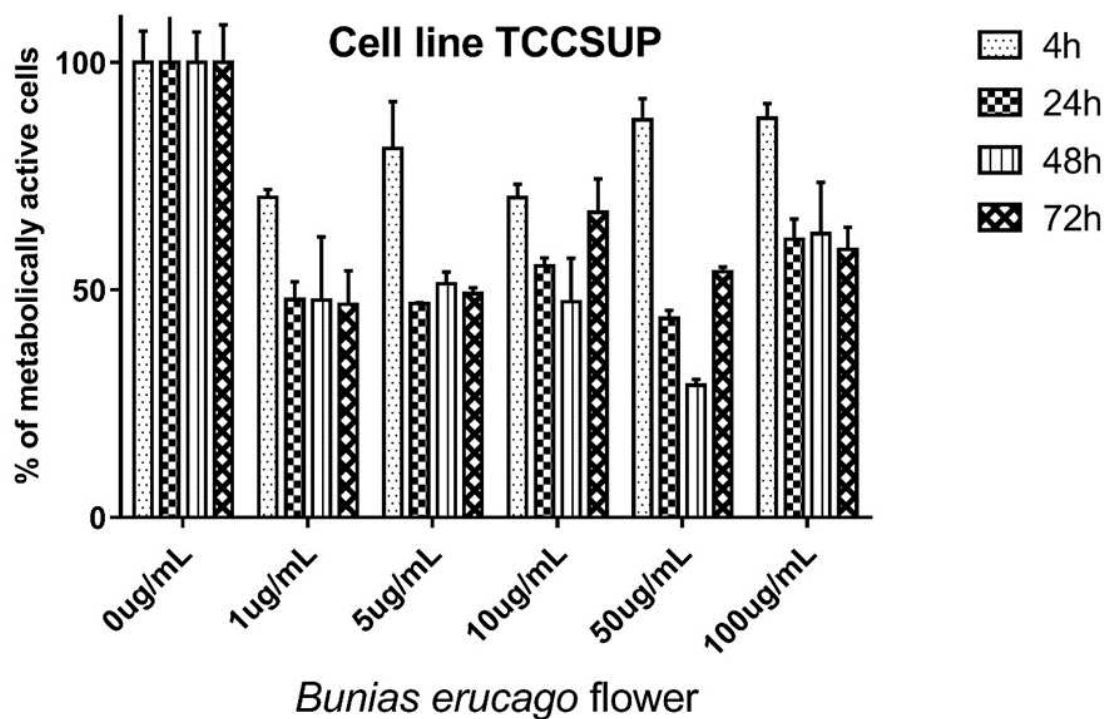
**Slika 20.** Ekstrakt iz *Allium neapolitanum* cvijet ne ostvaruje značajan učinak pri niti jednoj koncentraciji, ali blagi učinak se uočio pri svim koncentracijama pri različitim vremenima inkubacije.

#### 4.2.2 *Allium neapolitanum* stabljika + list



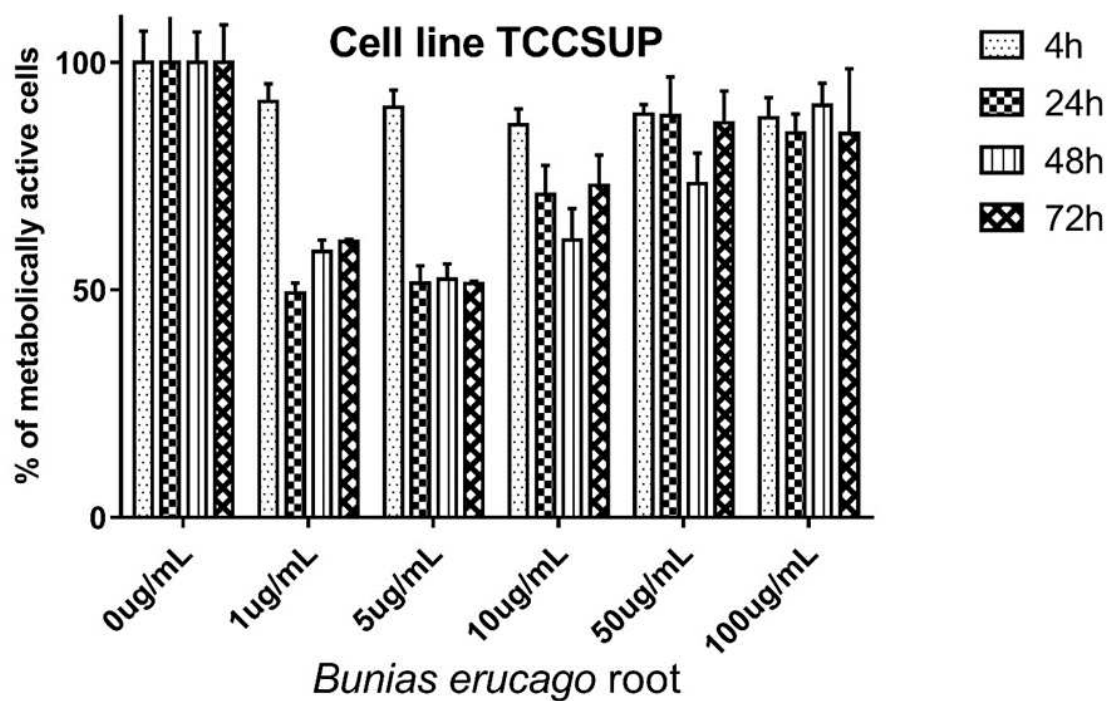
**Slika 21.** Ekstrakt iz *Allium neapolitanum* stabljika + cvijet ne ostvaruje značajan učinak pri niti jednoj koncentraciji, ali blagi učinak se uočio pri svim koncentracijama pri različitim vremenima inkubacije

#### 4.2.3 *Bunias erucago* cvijet



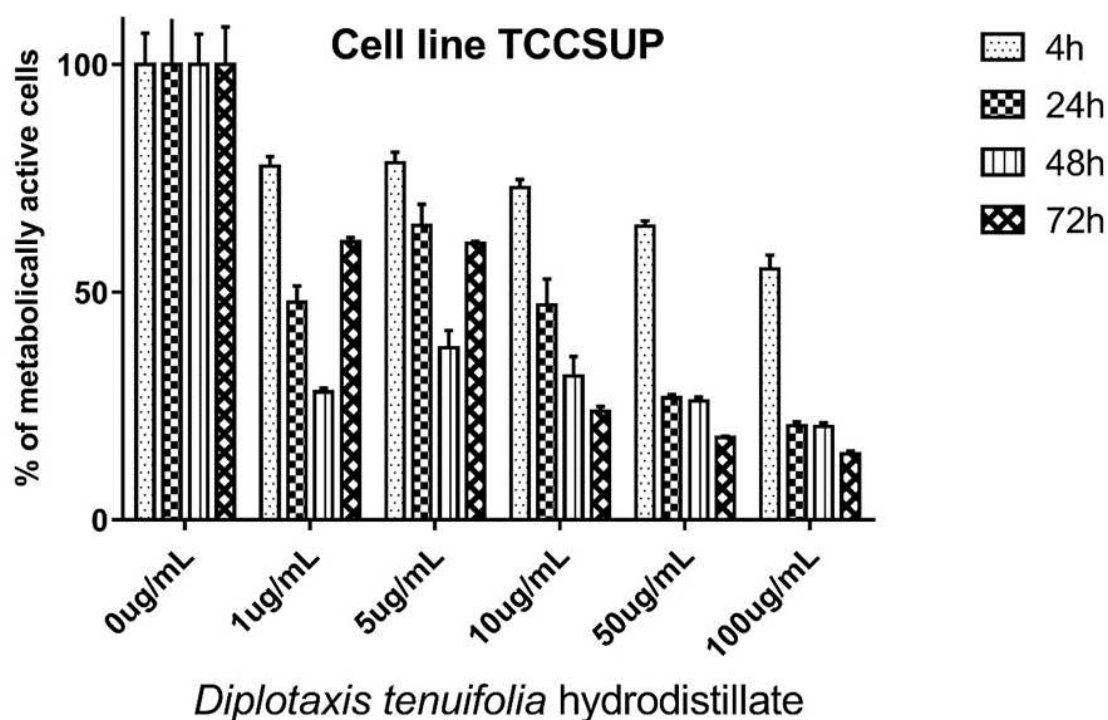
**Slika 22.** Ekstrakt iz *Bunias erucago* cvijet pokazuje značajan učinak pri svim koncentracijama već nakon 24h. Daljnjoj inkubacijom pri svim koncentracijama ne dolazi do značajne promjene broja metabolički aktivnih stanica. Najbolji učinak pokazuje koncentracija 50 µg/mL nakon 48h.

#### 4.2.4 *Bunias erucago* korijen



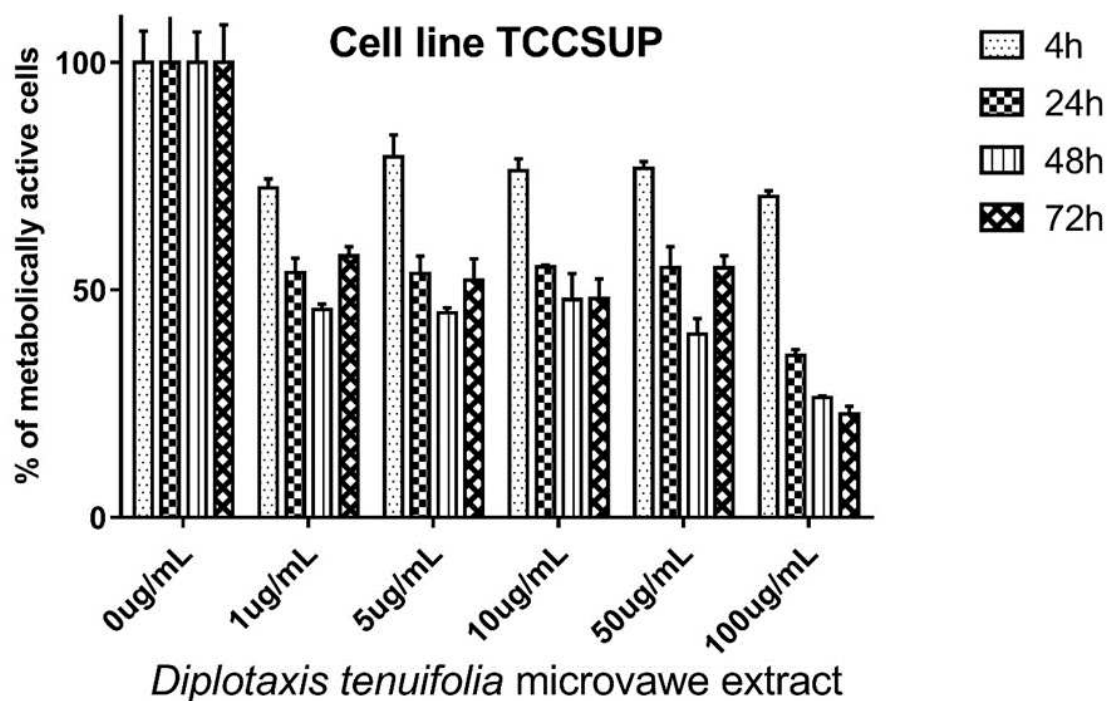
**Slika 23.** Ekstrakt iz *Bunias erucago* korijen neočekivano pokazuje najbolji učinak nakon 24h pri najnižim koncentracijama, dok se povećanjem koncentracije učinak značajno smanjuje.

#### 4.2.5 *Diplotaxis tenuifolia* hidrodestilat



**Slika 24.** Hidrodestilat *Diplotaxis tenuifolia* pokazuje značajan učinak prvi svim koncentracijama nakon 24h, a učinak je veći s porastom koncentracije. Daljnjom inkubacijom prvi svim koncentracijama broj metaboličkih stanica se značajno smanjuje, ali kod najnižih koncentracija nakon 72h dolazi do blagog oporavka stanica. Najbolji učinak ostvaruje koncentracija od 100 µg/mL nakon 72h.

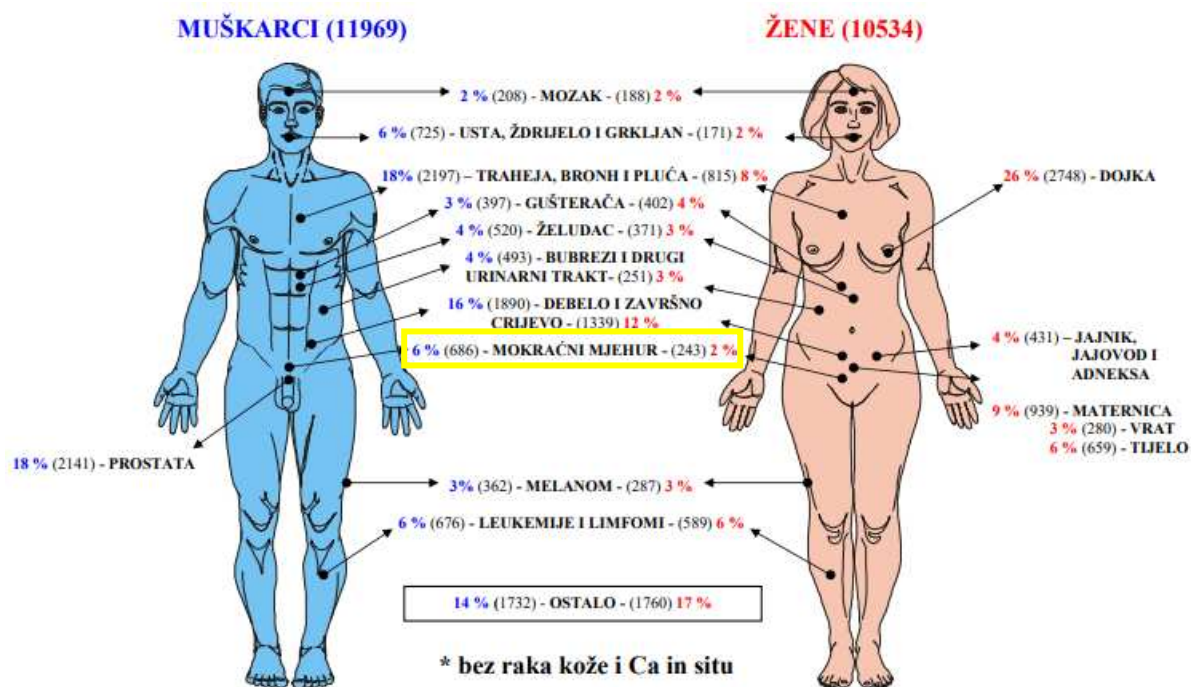
#### 4.2.6 *Diplotaxis tenuifolia* mikrovalni ekstrakt



**Slika 25.** Mikrovalni ekstrakt *Diplotaxis tenuifolia* pokazuje značajan učinak pri svim koncentracijama nakon 24h, a učinak je veći s porastom koncentracije. Daljnjom inkubacijom prvi svim koncentracijama broj metaboličkih stanica se značajno smanjuje, ali kod svih koncentracija, osim 100 µg/mL, nakon 72h dolazi do blagog oporavka stanica. Najbolji učinak ostvaruje koncentracija od 100 µg/mL nakon 72h.

## **5. RASPRAVA**

Karcinom je životno ugrožavajuća bolest karakterizirana abnormalnom proliferacijom stanica koje prodiru u okolna tkiva i uzrokuju oštećenje tih tkiva. Putem krvotoka i limfnog sustava karcinom se može proširiti i na udaljene organe. Često nije moguće procijeniti specifičan uzrok za svaku vrstu karcinoma. Međutim, poznati su određeni čimbenici koji mogu povećati rizik od karcinoma kao što su uporaba duhana, alkohol, zagađivači okoliša, infektivna sredstva te promjene životnih navika. Otprilike 10% do 15% karcinoma je nasljedno. Više od 6 milijuna smrti godišnje u svijetu uzrokovano je karcinomom, koji je postao ozbiljno zdravstveno pitanje kako zemalja u razvoju tako i onih razvijenih. Procjena je da je u 2012. godini bilo oko 14.1 milijun oboljelih od karcinoma, od čega je 7.4 milijuna muškaraca i 6.4 milijuna žena. Očekuje se da će broj oboljelih od karcinoma do 2035. godine povećati na 24 milijuna (20).



**Slika 26.** Raspodjela novooboljelih od raka prema sijelima u 2015. godini u Republici Hrvatskoj

(Preuzeto s: [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten\\_2015\\_rak\\_final.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten_2015_rak_final.pdf))

Karcinom mokraćnog mjehura je po učestalosti deveti karcinom na svijetu, a četrnaesti vodeći uzrok smrti. U prosjeku 3-4 puta češće obolijevaju muškarci nego žene. Učestalost i prevalencija vidljiva je u šestom desetljeću, a vrhunac je tijekom sedmog i osmog desetljeća.

Uglavnom je to bolest starije životne dobi. Različiti čimbenici rizika su važan razlog drugačije pojavnosti i smrtnih ishoda povezanih sa karcinomom mokraćnog mjehura u svijetu. Pušenje je odgovorno je za 50% slučajeva karcinoma mokraćnog mjehura i 65% invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura i vodeći je uzrok karcinoma mokraćnog mjehura u Sjedinjenim Američkim Državama. Ostali uzroci su profesionalna izloženost aromatičnim aminima i policikličkim aromatskim ugljikovodicima, način prehrane, zagađenje okoliša i genetičke predispozicije te infekcija uzrokovana *Schistosoma Haematobium*, koja je vodeći uzrok karcinoma mokraćnog mjehura u Africi (21).

Vjeruje se da će karcinom uskoro postati globalni problem sa svojim cjelokupnim pratećim teretom, stoga je terapija karcinoma u središtu svijeta. Za sada se liječenje malignosti temelji na kirurškim zahvatima, radioterapiji i antitumorskim lijekovima. Ovakav kompleksan pristup je sposoban liječiti otprilike polovicu pacijenata oboljelih od karcinoma. Dok druga polovica pacijenata ovakvim liječenjem može samo produžiti životni vijek bolesti, a neki nemaju nikakvu korist od liječenja. Rezultati kirurškog liječenja su blizu maksimalnog postignuća, za razliku od lijekova koji su daleko od zadovoljavajućeg uspjeha. Unatoč terapijskim dostignućima u procesu razumijevanja karcinogeneze, sveukupna smrtnost vjerojatno se neće mijenjati sve dok ne dođe do preusmjerenja koncepta liječenja prema upotrebi prirodnih proizvoda kao kemoprevencijskih agenata. Prirodni spojevi su vrlo raznolike strukture, mnogi su aromatske tvari, od kojih su većinom fenoli ili njihovi derivati supstituirani s kisikom. Međutim, povećana je pozornost na ekstrakte i biološki aktivne spojeve izolirane iz biljaka, koje se koriste u biljnoj medicini, zbog nuspojava i otpornosti patogena na antibiotike. Općenito, biljke proizvode mnogo sekundarnih metabolita koji su biosintetički izvedeni iz primarnih metabolita i predstavljaju važan izvor mikrobicida, pesticida i lijekova. Biljke imaju posebno mjesto u liječenju karcinoma. Procjenjuje se da spojevi izolirani iz biljaka čine 50% antitumorskih lijekova. Međutim, ovo područje nije toliko razvijeno u usporedbi s modernom medicinom, uglavnom zbog nedostatka znanstvenih dokaza (22). Sredinom 20. stoljeća upotreba biljaka je smanjena za četvrtinu zbog upotrebe sintetičkih spojeva u liječenju bolesti. Trenutno se situacija mijenja i preferira se upotreba biljaka zbog učinkovitosti, kemijske stabilnosti i manjeg broj nuspojava. Nacionalni institut za karcinom je prikazao oko 114 000 biljnih ekstrakata koji imaju antitumorsku aktivnost. Stoga je potrebno usredotočiti se na procjenu hoće li ovi ekstrakti biti izvor antitumorske aktivnosti ili se mogu koristiti u prevenciji ili oporavku organizma (23).

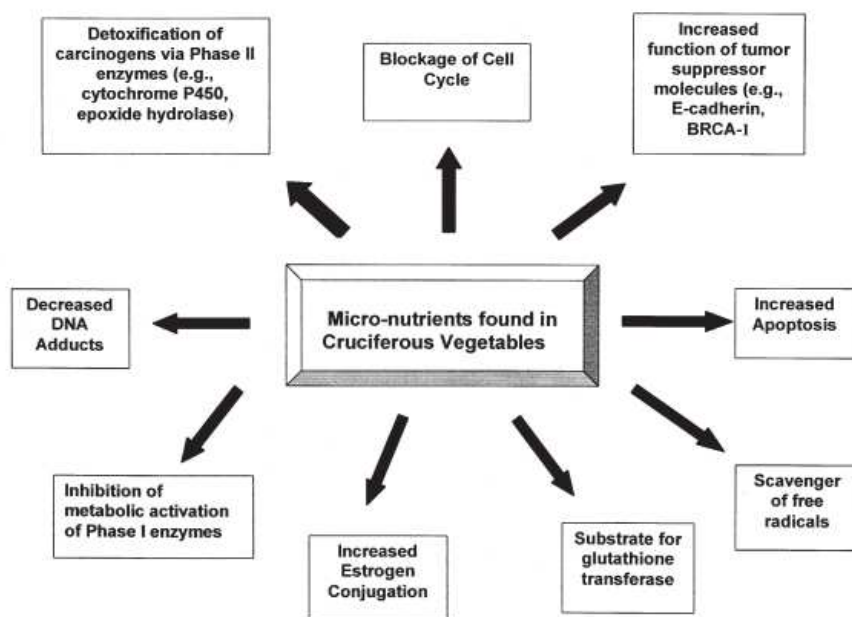
**Tablica 6.** Spojevi izolirani iz biljaka u tijeku kliničkih istraživanja(Preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4650206/> )

| Antitumorski spoj | Izoliran ili izveden iz:                                               | Aktivnost spoja                                                                                                                                         | Istraživanje i klinički razvoj                                                                              |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sulforafan        | Izotiocijanat iz roda <i>Brassica</i> koji pripada porodici kupusnjača | Inhibicija tumorskog rasta u karcinomu dojke, antiproliferativni učinak                                                                                 | Klinička istraživanja oralne primjene kupusnjača sa sulforafanom                                            |
| Paklitaksel       | Taksan, <i>Taxus brevifolia</i> L.                                     | Zaustavlja mitozu, inducira apoptozu, poremećaj stvaranja diobenog vretena                                                                              | Prva, druga i treća faza kliničkog istraživanja kod karcinoma dojke i karcinoma jajnika te kaposi karcinoma |
| Epipodofilotoksin | <i>Podophyllum peltatum</i> L., podofilotoksin izomer                  | Proapoptotski učinak, interferencija u stanični ciklus                                                                                                  | Istraživanje u liječenju limfoma i karcinoma testisa                                                        |
| Vinkristin        | <i>Catharanthus roseus</i> G. Don, Vinka alkaloidi                     | Antimitotsko djelovanje, inhibitor mikrotubula, stabilizator ili destabilizator mikrotubula, induktor zastoja staničnog razvoja, antitumorska aktivnost | Limfomi, sarkomi i leukemija, klinička istraživanja, kombinirana istraživanja                               |
| Vinblastin        |                                                                        |                                                                                                                                                         | Karcinom testisa, hodgkinov limfom, kombinirana klinička istraživanja                                       |
| Vinorelbin        |                                                                        |                                                                                                                                                         | Karcinom pluća nemalih stanica, faza I-III kliničkih istraživanja                                           |

|                         |                                                                               |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                            |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Vindesin                |                                                                               |                                                                                                                                                                                                     | Akutna limfocitna leukemija, klinička istraživanja                                                                                                         |
| Vinflunin               |                                                                               |                                                                                                                                                                                                     | Faza III kliničkih istraživanja solidnih tumora                                                                                                            |
| Pomiferin               | Izoflavonoid izoliran iz <i>Maclura pomifera</i> , <i>Dereeis Malaccensis</i> | Proapoptotski učinak, antioksidativni učinak, inhibicija deacetilacije histona, citotoksično djelovanje na karcinomske stanice                                                                      | Inhibicija rasta u šest humanih staničnih linija: ACHN (bubrezi), NCI-H23 (pluća), PC-3 (prostata), MDA-MB-231 (dojka), LOX-IMVI (melanom), HCT-15 (kolon) |
| Epigalokatehin galat    | Katehin, zeleni čaj                                                           | Antioksidativni učinak, smanjuje oštećenje uzrokovano oksidativnim stresom, antiproliferativni učinak, inhibicija određenih kinaza, inhibicija karcinogeneze inducirane kemikalijama ili UV zrakama | Faza I kliničkih istraživanja za oralnu primjenu kod karcinoma prostate                                                                                    |
| Kombrestatin A-4 fosfat | <i>Combretum caffrum</i>                                                      | Antiangiogeneza, tumorska nekroza                                                                                                                                                                   | Pretklinička i rana faza kliničkih istraživanja                                                                                                            |
| Roskovitin              | <i>Raphanus sativus</i> L. ( <i>Brassicaceaea</i> )                           | Inhibicija staničnog razvoja                                                                                                                                                                        | Faza II kliničkih istraživanja u Europi                                                                                                                    |

|              |                                                                                          |                                                                                         |                                                                                                      |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Flavopiridol | Sintetički flavonoid,<br><i>Dysoxylum binectariferum</i> Hook.f.<br>( <i>Meliaceae</i> ) | Protuupalni učinak, imunomodulatorna aktivnost                                          | Solidni tumori, limfomi i leukemija, klinička istraživanja faza I i II                               |
| Noskapin     | <i>Papaver somniferum</i>                                                                | Antiproliferativno djelovanje, inhibicija rasta tumorskih stanica i tumorske progresije | Faza I i II kliničkih istraživanja, ograničena progresija zbog ograničene solubilnosti, istraživanje |

Mnoge *in vitro* i *in vivo* studije ukazuju na mogući preventivni i antitumorski učinak preparata kupusnjača i njihovih spojeva. Ljekovita vrijednost kupusnjača poznata je još od antičkih vremena. U posljednjih nekoliko godina pozornost je usmjerena na antitumorske učinke kupusnjača. Epidemiološki podatci nekoliko studija pokazuju povezanost između konzumacije kupusnjača i antitumorske aktivnosti. Od sedam potencijalnih istraživanja, pet je prijavilo inverznu povezanost između konzumacije jedne ili više biljaka iz porodice kupusnjača i rizika od karcinoma. Slično tome, ispitani su i dokazi slučajeva iz studija. Potrošnja kupusa, brokule, cvjetača ili prokulica je obrnuto povezana s rizikom raka u 37 (70%) studija, dok 11 (20%) nisu izvijestili nikakvu povezanost, a 7 (13%) pokazalo je pozitivnu povezanost između kupusnjača i rizika od karcinoma. Također, proučavana je povezanost između ne-Hodgkinovog limfoma i unosa povrća. Istraživanje je otkrilo da je veći unos kupusnjača bio povezan sa relativnim rizikom (RR) od 0.67 za ispitanike koji su konzumirali pet ili više obroka tjedno u usporedbi sa ispitanicima koji su konzumirali kupusnjače manje od dva puta tjedno (24). *In vitro* istraživanje pokazalo je pozitivan učinak izotiocijanata, spojeva izoliranih iz kupusnjača, na smanjenje broja metabolički aktivnih stanica glioblastoma A1235, kao i značajan utjecaj na stanice karcinoma mokraćnog mjehura T24 (25). Ove studije pružaju dokaze koji potvrđuju antitumorski učinak kupusnjača.



**Slika 27.** Predloženi mehanizmi djelovanja kupusnjača  
(Preuzeto s: file:///C:/Users/krist/Downloads/05.%2009.%202018.\_Cruciferou.pdf )

Metastaze i recidivi karcinoma mokraćnog mjehura glavni su razlozi za njegovu slabu prognozu i visoku stopu smrtnosti. Zbog biološke aktivnosti i visoke metaboličke aktivacije u mokraći, sulforafan, spoj koji se isključivo nalazi u kupusnjačama, ima snažan i karakterističan potencijal za sprječavanje raka mokraćnog mjehura. Dokazano je da značajno blokira različite biokemijske puteve, uključujući adheziju, invaziju, i kemotaksiju u T24 stanicama karcinoma mokraćnog mjehura. Transfekcija ciklooksigenazom 2 (COX-2), uvelike je zaustavila inhibiciju ekspresije MMP2/9 i invazivnu sposobnost stanica. Štoviše, sulforafan inhibira proces koji je temelj invazije tumorskih stanica, epitelno-mezenhimalnu tranziciju i migraciju posredovanu E-kadherinom. Studija pokazuje terapijski potencijal sulforafana u sprečavanju ponovnog pojavljivanja karcinoma mokraćnog mjehura (26).

Kao predmet našeg istraživanja korišteni su različiti ekstrakti biljnih vrsta *Allium neapolitanum* Cirillo, *Bunias erucago* L. i *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC, odnosno promatran je njihov citotoksični učinak na dvije stanične linije humanog karcinom mokraćnog mjehura: T24 i TCCSUP.

Utjecaj na staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura T24 kod većine korištenih ekstrakata je značajan pri nižim koncentracijama od 1 µg/mL i 10 µg/mL, dok je kod ekstrakata

biljne vrste *Allium neapolitanum* Cirillo učinak značajan pri višim koncentracijama 50 µg/mL i 100 µg/mL. Najbolji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica ostvaruju ekstrakti od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

*In vitro* istraživanje na stanicama mokraćnog mjehura TCCSUP pokazalo je da svi ekstrakti imaju određeni učinak na smanjenje postotka metabolički aktivnih stanica pri svim koncentracijama, a najbolji učinak ostvaruje mikrovalni ekstrakt biljne vrste *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

Na temelju navedenih rezultata, vidljivo je da biljne vrste iz porodice kupusnjača i spojevi izolirani iz njih imaju veliki potencijal za nadopunu liječenja različitih bolesti, a posebno su važna njihova kemoprevencijska i antitumorska svojstva, koja smo u našem *in vitro* ispitivanju pokazali na stanicama karcinoma mokraćnog mjehura (T24 i TCCSUP). Postotak smanjenja metabolički aktivnih stanica, tj, citotoksični učinak povezan je s koncentracijom i vremenu izlaganja, te je glavna hipoteza potvrđena i cilj istraživanja je ostvaren. Potrebno je provesti dodatna *in vivo* istraživanja, koja će utvrditi pozitivne učinke, kako bi se ovi spojevi ili lijekovi temeljeni na njihovoj strukturi, mogli uvrstiti u terapiju različitih bolesti.

## **6. ZAKLJUČAK**

- 1) *In vitro* izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura (T24 i TCCSUP) ekstraktima izoliranim iz biljne porodice kupusnjača (*Brassicaceae*) dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica.
- 2) Ispitivani ekstrakti pokazuju citotoksični učinak ovisan o koncentraciji i vremenu inkubacije.
- 3) Djelovanje izoliranih ekstrakata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica.

## **7. LITERATURA**

- 1) Vrdoljak, E, Belac-Lovasović I, Kusić, Z, Gugić, D, Juretić, A, Biologija raka. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. 3. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp.3-4.
- 2) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- 3) Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015., Bilten 40. [Online].; 2018. [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten\\_2015\\_rak\\_final.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/03/Bilten_2015_rak_final.pdf) Datum pristupa: 1.7.2018.
- 4) Vrdoljak, E, Belac-Lovasović I, Kusić, Z, Gugić, D, Juretić, A, Biologija raka. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. 3. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp.4-14.
- 5) Dobruch, J., et al. (2016). Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology and Outcomes. European Urology, 69, pp. 300-310. [http://www.europeanurology.com/article/S0302-2838\(15\)00782-4/pdf](http://www.europeanurology.com/article/S0302-2838(15)00782-4/pdf) Datum pristupa: 07.07.2018.
- 6) Vrdoljak, E, Belac-Lovasović I, Kusić, Z, Gugić, D, Juretić, A, Tumori mokraćnog sustava. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. 3. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp.154-159.
- 7) Plants of the World online, Royal Botanic Gardens, Kew [Internet] <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:279435-1> Datum pristupa: 10.08.2018.
- 8) Linus Pauling Institute. Oregon State University. Cruciferous Vegetables. 2018. [Internet] <https://lpi.oregonstate.edu/mic/food-beverages/cruciferous-vegetables#introduction> Datum pristupa: 10.08.2018.
- 9) Linus Pauling Institute. Oregon State University. Isotyocianates. 2018. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyantes> Datum pristupa: 10.08.2018.
- 10) Plantnet-project.org [Internet] <http://publish.plantnet-project.org/project/plantinvasivekruger/collection/collection/synthese/details/ALLNE> Datum pristupa: 12.08.2018.
- 11) Brkić, R. (2017.) Allium Neapolitanum Cirillo: Utjecaj autolize na kemijski sastav sumporovih spojeva dobivenih hidroddestilacijom. Završni rad. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet

- 12) Casiglia S, Bruno M, Senatore F, Senatore F. Composition of the Essential Oil of *Allium neapolitanum* Cirillo Growing Wild in Sicily and its Activity on Microorganisms Affecting Historical Art Crafts. *J Oleo Sci.* 2015;64(12):1315-1320. doi: 10.5650/jos.ess15188.
- 13) Priroda i biljke [Internet] <https://www.plantea.com.hr/cunjasti-repusac/> Datum pristupa: 15.08.2018.
- 14) Sedlar, A. Izolacija i identifikacija hlapljivih sumporovih spojeva odabranih biljaka porodice Brassicaceae. Diplomski rad. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet
- 15) Priroda i biljke [Internet] <https://www.plantea.com.hr/uskolisni-dvoredac/> Datum pristupa: 15.08.2018.
- 16) Bell L, Oruna-Concha MJ, Wagstaff C. Identification and quantification of glucosinolate and flavonol compounds in rocket salad (*Eruca sativa*, *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*) by LC-MS: highlighting the potential for improving nutritional value of rocket crops. *Food Chem.* 2015 Apr 1;172:852-861. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.116. Epub 2014 Sep 30.
- 17) Flora Croatica Database [Internet] <http://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=27388> Datum pristupa: 17.08.2018.
- 18) Flora Croatica Database [Internet] <https://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=1938> Datum pristupa: 17.08.2018.
- 19) Flora Croatica Database [Internet] <https://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=3641> Datum pristupa: 17.08.2018.
- 20) Sultana S, Asif HM, Nazar HM, Akhtar N, Rehman JU, Rehman RU. Medicinal plants combating against cancer--a green anticancer approach. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(11):4385-4394.
- 21) MahdaviFar N, Ghoncheh M, Pakzad R, Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiology, incidence and mortality of bladder cancer and their relationship with the development index in the world. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(1):381-386.
- 22) Greenwell M, Rahman PK. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *Int J Pharm Sci Res.* 2015 Oct 1;6(10):4103-4112.

- 23) Sultana S, Asif HM, Nazar HM, Akhtar N, Rehman JU, Rehman RU. Medicinal plants combating against cancer--a green anticancer approach. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(11):4385-94
- 24) Murillo G<sup>1</sup>, Mehta RG. Cruciferous vegetables and cancer prevention. *Nutr Cancer*. 2001;41(1-2):17-28.
- 25) Župić, M. Citotoksično djelovanje izotiocijanata iz porodice kupusnjača na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom. Diplomski rad. Split: Medicinski fakultet
- 26) Shan Y<sup>1</sup>, Zhang L, Bao Y, Li B, He C, Gao M, Feng X, Xu W, Zhang X, Wang S. Epithelial-mesenchymal transition, a novel target of sulforaphane via COX-2/MMP2, 9/Snail, ZEB1 and miR-200c/ZEB1 pathways in human bladder cancer cells. *J Nutr Biochem*. 2013 Jun;24(6):1062-9. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.08.004. Epub 2012 Nov 13.

## **8. SAŽETAK**

### **Cilj istraživanja:**

Cilj je istraživanja ispitati potencijalno citotoksično djelovanje ekstrakata izoliranih iz biljaka iz porodice kupusnjača (*Brassicaceae*) na humane karcinomske stanice mokraćnog mjehura (T24 i TCCSUP). Pretpostavka je da će se nakon izlaganja karcinomskih stanica biljnim ekstraktima njihov broj smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

### **Materijali i metode:**

Ispitivanje citotoksičnosti na staničnim linijama karcinoma mokraćnog mjehura rađeno je MTT testom. Usporedbom apsorbancije nastalog formazana kod stanica tretiranih biljnim ekstraktima i apsorbancije kod netretiranih stanica (kontrola), dobili smo postotak preživljenja karcinomskih stanica. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72 sata.

### **Rezultati:**

Rezultati su prikazani grafički u odnosu vremena inkubacije i postotka metabolički aktivnih stanica.

Kod stanica karcinoma mokraćnog mjehura (T24) svi biljni ekstrakti ostvaruju bolji učinak pri višim koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL, pri različitim vremenima inkubacije. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica imaju hidrodestilat i mikrovalni ekstrakt iz *Diplotaxis tenuifolia* pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

Kod druge stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura (TCCSUP) većina biljnih ekstrakata najjači citotoksični učinak ima pri višim koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL, pri različitim vremenima inkubacije. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica imaju hidrodestilat i mikrovalni ekstrakt pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

### **Zaključci:**

*In vitro* izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura (T24 i TCCSUP) biljnim ekstraktima dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica. Citotoksični učinak ovisan je o vremenu inkubacije i koncentraciji. Djelovanje ekstrakata nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica. Citotoksični učinak ekstrakata, što je ujedno i hipoteza našeg ispitivanja, je potvrđen, a idući korak je potvrđivanje tih učinaka *in vivo* ispitivanjem na modelima karcinoma mokraćnog mjehura kod životinja.

## **9. SUMMARY**

## **The aim of the research**

The aim of the research is to examine the potential cytotoxic effects of extracts from the *Brassicaceae* family of plants on human carcinoma cells of urinary bladder (T24 and TCCSUP). The assumption is that after the exposure of carcinoma cells to extracts their number will be reduced in comparison to the control group.

## **Materials and methods**

MTT assay was used to establish cytotoxicity levels on urinary bladder cancer cell lines. The comparison between the absorbance of created formazan in cells treated with extracts and those untreated (the control group) established the survival rates of carcinoma cells. Cytotoxicity levels were established after the periods of 4, 24, 48 and 72 hours.

## **Results**

The results are graphically presented in relation to incubation times and the percentages of metabolically active cells.

In urinary bladder carcinoma cells T24 all extracts show better effects in higher concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL, with different incubation times. The most prominent effect on the reduction of metabolically active cells is achieved by hydrodistillate and microvawe extract of *Diplotaxis tenuifolia* at a concentration of 100 µg/mL after 72-hour incubation time.

In other urinary bladder carcinoma cells TCCSUP most extracts have the strongest effect at higher concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL, with different incubation times. The most significant effect on the reduction of metabolically active cells is achieved by hydrodistillate and microvawe extract of *Diplotaxis tenuifolia* at a concentration of 100 µg/mL after 72-hour incubation time.

## **Conclusions**

*In vitro* exposure of urinary bladder carcinoma cells (T24 and TCCSUP) to extracts leads to reduced cell survival rate. Cytotoxic effects depend on incubation time and concentration. Herbal extracts effect is not always proportional to the increase in concentration and incubation time and in some cases cell recovery occurs. The cytotoxic effect of extracts is confirmed, which was the hypothesis of the research, and the next step is the validation of these effects by *in vivo* studies on the models of animal urinary bladder cancers.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**OSOBNİ PODACI:**

**Ime i prezime:** Kristina Vukančić

**Datum rođenja:** 12.07.1993.

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Adresa:** Ive Andrića 10, Glina

**e-mail:** kristina.vukancic19@gmail.com

**OBRAZOVANJE:**

- **2000. – 2007.** Osnovna škola “Dr. Ivan Merz”, Drvar, Bosna i Hercegovina
- **2007. – 2008.** Osnova škola “Glina”, Glina, Republika Hrvatska
- **2008. – 2012.** Srednja škola “Glina”, Glina, Republika Hrvatska
- **2012. – 2018.** Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, studij Farmacija

**RADNO ISKUSTO:**

**Ožujak, 2017. – Rujan, 2017.** – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Blatine

**CPSA Split** (Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske)

**POSEBNE VJEŠTINE:**

**Rad na računalu:** MS Office, Eskulap 2000

**Strani jezici:** engleski jezik

**Volonterski rad:** Skac\_st (Studentski katolički centar Split)